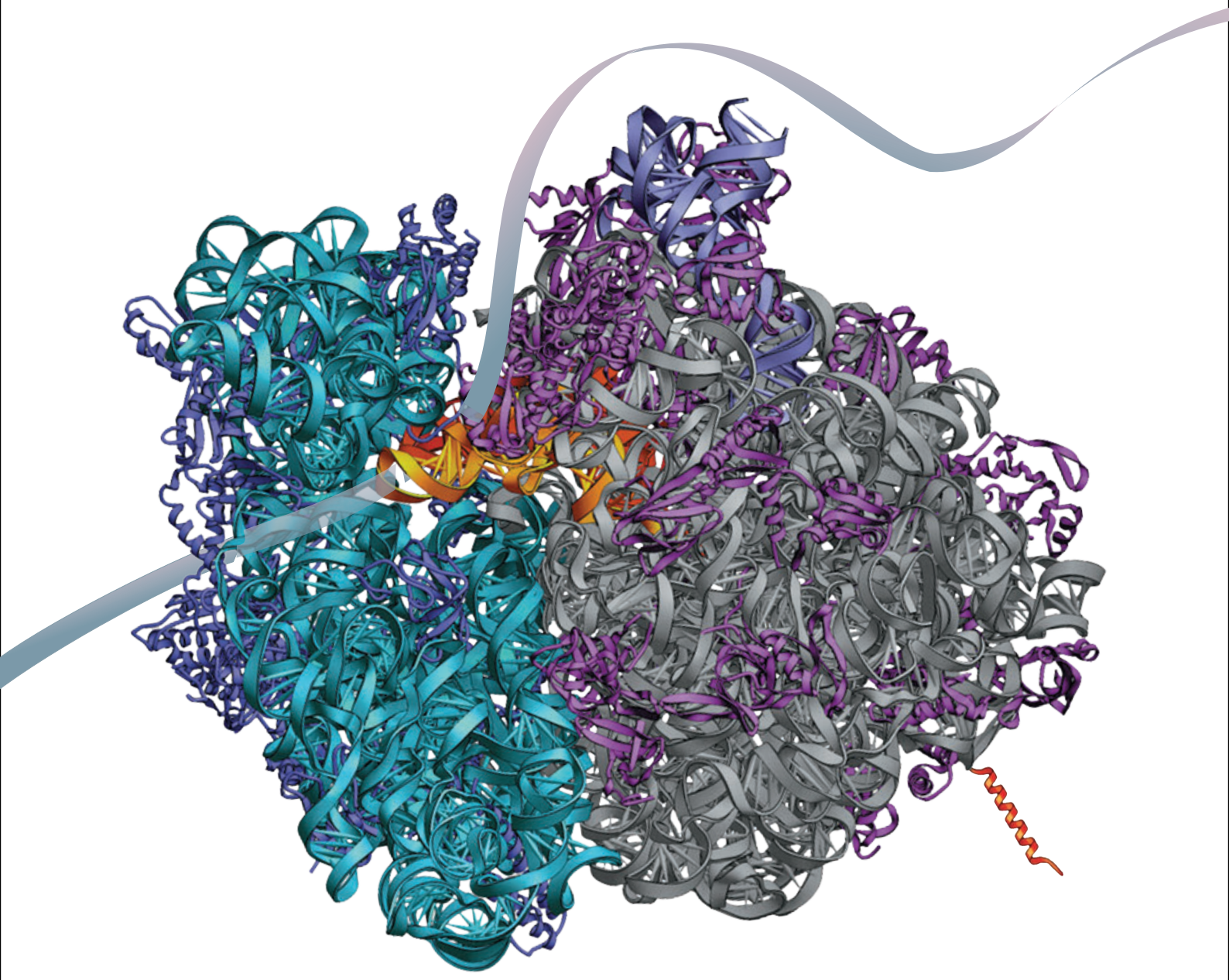
CUARTA EDICIÓN (Correspondiente a la quinta edición original)

BIOQUÍMICA

LIBRO DE TEXTO CON APLICACIONES CLÍNICAS

THOMAS M. DEVLIN



EDITORIAL REVERTÉ

ABREVIATURAS EN BIOQUÍMICA

A (o Ade)	adenina
Ab	anticuerpo
ACP	proteína transportadora de acilo
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
acil coA	derivado acilo de CoA
ADH	hormona antidiurética
ADP	adenosina difosfato
Ag	antígeno
Ala	alanina
ALA	ácido aminolevulínico
AMP	adenosina monofosfato
cAMP	AMP cíclico
cAMP (cyclic AMP)	adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico
Arg	arginina
ARS	secuencia de replicación autónoma
Asn	asparagina
Asp	aspartato
ATP	adenosina trifosfato
bp	par de bases
C (o Cyt)	citosina
CaM	calmodulina
CAP	proteína activadora de gen por catabolito
CDP	citidina difosfato
CMP	citidina monofosfato
CTP	citidina trifosfato
CoA o CoASH	coenzima A
CoQ	coenzima Q (ubiquinona)
Cys	cisteína
d	2′-desoxirribo
dd	didesoxi
Da	Dalton
DHF	dihidrofolato
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dol	dolicol
dopa	3,4-dihidroxifenilalanina
dTDP	timidina difosfato
dTMP	timidina monofosfato
dTTP	timidina trifosfato
DPN^+	*véase* NAD^+
DPNH	*véase* NADH
EF	factor de alargamiento
FAD	flavina adenina dinucleótido (forma oxidada)
$FADH_2$	flavina adenina dinucleótido (forma reducida)
Fp	flavoproteína
G	energía libre de Gibbs
G (o Gua)	guanina
Gal	galactosa
GDP	guanosina difosfato
Glc	glucosa
Gln	glutamina
Glu	glutamato
Gly	glicina
GMP	guanosina monofosfato
GTP	guanosina trifosfato
GSH	glutatión
Hb	hemoglobina
HbCO	hemoglobina ligada a monóxido de carbono
HbO_2	oxihemoglobina
HDL	lipoproteína de alta densidad
HMG CoA	β-hidroxi-β-metilglutaril CoA
hnRNA	RNA nuclear heterogéneo
HX	hipoxantina
IDL	lipoproteína de densidad intermedia
IF	factor de inicio
IgG	inmunoglobulina G
Ile	isoleucina
IP_3 (Ins P_3)	inositol 1,4,5 trifosfato
IDP	inosina difosfato
IMP	inosina monofosfato
IS	secuencia de inserción
ITP	inosina trifosfato
K_m	constante de Michaelis–Menten
LDL	lipoproteína de baja densidad
Leu	leucina
Lys	lisina
m	mili (10^{-3})
M	molar
MB	metabolismo basal
Mb	mioglobina
MbO_2	oximioglobina
Met	metionina
Met Hb	methemoglobina
mol	mol
NAD^+	nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
$NADP^+$	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucléotido fosfato (forma reducida)
PC	fosfatidil colina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PE	fosfatidiletanolamina
PEP	fosfo*enol*piruvato
PG	prostaglandina
Phe	fenilalnina
PI	fosfatidilinositol
PLP	piridoxal 5-fosfato
P_i	ortofosfato inorgánico
PP_i	pirofosfato inorgánico
Pro	prolina
PRPP	fosforribosilpirofosfato
RER	retículo endoplasmático rugoso
RF	factor de liberación
RFLP	polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción
RDA	asignaciones dietéticas recomendadas
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosómico
tRNA	RNA de transferencia
RNasa	ribonucleasa
RQ	cociente respiratorio (producción de CO_2/consumo de O_2)
S	unidad Svedberg
Ser	serina
SH	sulfhidrilo
SnRNA	RNA nuclear pequeño
SnRNP	ribonucleoproteína nuclear pequeña
SSB	proteína de unión a cadena sencilla
T (o Thy)	timina
TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs)
TF	factor de transcripción
TG	triacilglicerol
THF	ácido tetrahidrofólico
Thr	treonina
TPN^+	*véase* $NADP^+$
TPNH	*véase* NADPH
TPP	tiamina pirofosfato
Trp	triptófano
TTP	timidina trifosfato
Tyr	tirosina
U (o Ura)	uracilo
UDP	uridina difosfato
UDP-galactosa	uridina difosfato galactosa
UDP-glucosa	uridina difosfato glucosa
UMP	uridina monofosfato
UTP	uridina trifosfato
Val	valina
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad
YAC	cromosoma artificial de levadura

BIOQUÍMICA

LIBRO DE TEXTO CON APLICACIONES CLÍNICAS

Cuarta edición

COORDINADA POR

Thomas M. Devlin, Ph.D.

Professor Emeritus
Department of Biochemistry
School of Medicine
MCP-Hahnemann University
Philadelphia, Pennsylvania

EDITORIAL REVERTÉ, S. A.

Barcelona - Bogotá - Buenos Aires - Caracas - México

Título de la obra original:
Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Fifth Edition

Edición original en lengua inglesa publicada por:
John Wiley & Sons, Inc., 111 River Street, Hoboken, New Jersey 07030 – USA.

Copyright © John Wiley & Sons, Inc.

Edición en español:
© EDITORIAL REVERTÉ, S. A., 2004, 2008, 2015

Edición en papel:
ISBN: 978-84-291-7213-3 Obra completa
ISBN: 978-84-291-7211-9 Volumen I
ISBN: 978-84-291-7212-6 Volumen II

Edición e-book (PDF):
ISBN: 978-84-291-9434-0

Versión española por:
Dr. Francesc Canals[1]
Dr. Claudi M. Cuchillo[2]
Dra. Sònia Segura[2]
Dr. Pere Suau[2]

Revisada por:
Dr. Claudi M. Cuchillo[2]

[1] Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona
[2] Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona

Propiedad de:
EDITORIAL REVERTÉ, S. A.
Loreto, 13-15, Local B
08029 Barcelona – España
Tel: (34) 93 419 33 36
Fax: (34) 93 419 51 89
e-mail: reverte@reverte.com
Internet: http://www.reverte.com

Reservados todos los derechos. La reproducción total o parcial de esta obra, por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo públicos, queda rigurosamente prohibida sin la autorización escrita de los titulares del copyright, bajo las sanciones establecidas por las leyes.

#1232

A Marjorie,
mi mejor amiga, compañera y amada esposa.

AUTORES

Carol N. Angstadt, Ph.D.
Professor Emerita
Department of Arts and Sciences
MCP Hahnemann University
490 S. Old Middletown Road
Media, PA 19063

Email: angstadtc@drexel.edu

William Awad, JR., M.D., Ph.D.
Professor
Departments of Medicine and
of Biochemistry
University of Miami School of Medicine
PO Box 016960
Miami, FL 33101

Email: wawad@med.miami.edu

Diana S. Beattie, Ph.D.
Professor and Chair
Department of Biochemistry
West Virginia University School
of Medicine
PO Box 9142
Morgantown, WV 26506-9142

Email: dbeattie@hsc.wva.edu

Stephen G. Chaney, Ph.D.
Professor
Departments of Biochemistry and Biophysics,
and of Nutrition
School of Medicine CB# 7260
University of North Carolina at Chapel Hill
Mary Ellen Jones Building
Chapel Hill, NC 27599-7260

Email: stephen_chaney@med.unc.edu

Marguerite W. Coomes, Ph.D.
Associate Professor
Department of Biochemistry
and Molecular Biology
Howard University College of Medicine
520 W Street, N.W.
Washington, DC 20059-0001

Email: mcoomes@fac.howard.edu

Joseph G. Cory, Ph.D.
Professor and Chair
600 Moye Blvd
Department of Biochemistry
Brody School of Medicine
East Carolina University
Greenville, NC 27858-4354

Email: coryjo@mail.ecu.edu

David W. Crabb, M.D.
John B. Hickam Professor and Chair
Department of Medicine
Indiana University School of Medicine
Emerson Hall 317
545 Barnhill Drive
Indianapolis, IN 46202-5124

Email: dcrabb@iupui.edu

Thomas M. Devlin, Ph.D.
Professor Emeritus
Department of Biochemistry
School of Medicine
MCP Hahnemann University
159 Greenville Court
Berwyn, PA 19312-2071

Email: tdevlin@drexel.edu

John E. Donelson, Ph.D.
Professor and Head
Department of Biochemistry
University of Iowa College of Medicine
Bowen Science Building
Iowa City, IA 52242-0001

Email: john-donelson@uiowa.edu

Howard J. Edenberg, Ph.D.
Chancellor's Professor
Department of Biochemistry and Molecular
Biology
Indiana University School of Medicine
635 Barnhill Drive, Med. Sci. 4063
Indianapolis, IN 46202-5122

Email: edenberg@iupui.edu

Robert H. Glew, Ph.D.
Professor
Department of Biochemistry
and Molecular Biology
Basic Medical Science Building, Room 249
School of Medicine
University of New Mexico
915 Camino de Salud NE
Albuquerque, NM 87131-5221

Email: rglew@salud.unm.edu

Dohn G. Glitz, Ph.D.
Professor Emeritus
Department of Biological Chemistry
UCLA School of Medicine
11260 Barnett Valley Road
Sebastopol, CA 95472

Email: dglitz@biochem.medsch.ucla.edu

Robert A. Harris, Ph.D.
Distinguished Professor
Showalter Professor and Chair
Department of Biochemistry
and Molecular Biology
Indiana University School of Medicine
635 Barnhill Drive
Indianapolis, IN 46202-5122

Email: raharris@iupui.edu

Ulrich Hopfer, M.D., Ph.D.
Professor
Department of Physiology and Biophysics
Case Western Reserve University
10900 Euclid Ave.
Cleveland, OH 44106-4970

Email: uxh@po.cwru.edu

Michael N. Liebman, Ph.D.
Director of Computational Biology
University of Pennsylvania Cancer Center
Abramson Family Cancer Research Institute
511 BRB II/III
University of Pennsylvania School
of Medicine
421 Curie Boulevard
Philadelphia, PA 19104

Email: liebmanm@mail.med.upenn.edu

Gerald Litwack, Ph.D.
Professor and Chair
Department of Biochemistry and Molecular
Pharmacology
Jefferson Medical College
Thomas Jefferson University
233 South 10th Street
Philadelphia, PA 19107

Email: gerry.litwack@mail.tju.edu

Bettie Sue Siler Masters, Ph.D.
Robert A. Welch Professor of Chemistry
Department of Biochemistry
University of Texas Health Science Center
at San Antonio
7703 Floyd Curl Drive
San Antonio, TX 78229-3900

Email: masters@uthscsa.edu

J. Denis McGarry, Ph.D.
Professor
Departments of Internal Medicine
and of Biochemistry
University of Texas Southwestern Medical
Center at Dallas
Bldg. G5, Room 210
5323 Harry Hines Blvd
Dallas, TX 75235-9135

Email: dmcgar@mednet.swmed.edu

Richard T. Okita, Ph.D.
Professor and Associate Chair
Department of Pharmaceutical Science
Washington State University
PO Box 646534
Pullman, WA 99164-6534

Email: okitar@wsu.edu

Francis J. Schmidt, Ph.D.
Professor
Department of Biochemistry
School of Medicine
Univ. of Missouri-Columbia
M121 Medical Sciences
Columbia, MO 65212-0001

Email: schmidtf@missouri.edu

Thomas J. Schmidt, Ph.D.
Professor
Department of Physiology and Biophysics
University of Iowa College of Medicine
5-610 Bowen Science Building
Iowa City, IA 52242-1109

Email: thomas-schmidt@uiowa.edu

Richard M. Schultz, Ph.D.
Professor
Division of Molecular and Cellular
Biochemistry
Department of Cell Biology, Neurobiology,
and Anatomy
Stritch School of Medicine
Loyola University of Chicago
2160 South First Avenue
Maywood, IL 60153

Email: rschult@lumc.edu

Nancy B. Schwartz, Ph.D.
Professor
Departments of Pediatrics and of
Biochemistry and Molecular Biology
University of Chicago, MC 5058
5841 S. Maryland Ave.
Chicago, IL 60637-1463

Email: n-schwartz@uchicago.edu

Thomas E. Smith, Ph.D.
Professor
Department of Biochemistry
and Molecular Biology
College of Medicine
Howard University
520 W Street, N.W.
Washington, DC 20059

Email: tsmith@fac.howard.edu

Gerald Soslau, Ph.D.
Professor
Department of Biochemistry
School of Medicine, M.S. 344
MCP Hahnemann University
245 North 15th Street
Philadelphia, PA 19102-1192

Email: Gerald.Soslau@drexel.edu

Daniel L. Weeks, Ph.D.
Professor
Department of Biochemistry
University of Iowa College of Medicine
Bowen Science Building
Iowa City, IA 52242

Email: daniel-weeks@uiowa.edu

Stephen A. Woski, Ph.D.
Associate Professor
Department of Chemistry
University of Alabama
Box 870336
Tuscaloosa, AL 35487-0336

Email: swoski@bama.ua.edu

J. Lyndal York, Ph.D.
Professor
Department of Biochemistry and Molecular Biology
College of Medicine
University of Arkansas for Medical Science
4301 W. Markham St.
Little Rock, AR 72205-7199

Email: yorklyndal@uams.edu

PREFACIO

Los objetivos de la quinta edición del Libro de Texto de Bioquímica con Aplicaciones Clínicas son: presentar una discusión clara y precisa de la bioquímica de las células de mamífero y, cuando esté justificado, de células procarióticas y eucarióticas: relacionar los hechos bioquímicos a nivel celular con los procesos fisiológicos que tienen lugar en el animal entero; y citar ejemplos de procesos bioquímicos anormales en enfermedades humanas. Estos continúan siendo los mismos que en anteriores ediciones. La amplitud y profundidad de la presentación deberían satisfacer los requerimientos de la mayor parte de cursos de bioquímica. Los temas incluidos se seleccionaron para cubrir las áreas esenciales tanto de la bioquímica como de la química fisiológica para estudiantes de licenciatura, a nivel de graduado y para cursos de bioquímica especiales en escuelas profesionales. Dado que la aplicación de la bioquímica es tan importante para la medicina humana, el texto continúa teniendo un énfasis decisivo sobre la bioquímica de las células de mamífero. Se presenta información sobre investigaciones bioquímicas en procariotas y otros eucariotas cuando estos estudios son la fuente primera de conocimiento sobre el tema. El libro de texto está organizado y escrito de tal manera que se puede presentar según cualquier secuencia de temas que considere oportuna el profesor.

Los rápidos avances en el conocimiento en las ciencias biológicas, debido especialmente a las técnicas de la biología molecular, y la continua evolución de los cursos de bioquímica, requirieron un replanteamiento crítico de la secuencia de temas y del contenido de cada capítulo de la anterior edición. Tanto editor como contribuyentes buscaron información a partir de enseñantes de bioquímica en esta revisión no excluyéndose parte alguna de la evaluación. El resultado fue una decisión de cambiar la secuencia del material pero mantener la división del material en los mismos capítulos, excepto para combinar en un solo capítulo la presentación de las estructuras de los ácidos nucleicos. Se eliminó el capítulo sobre Transporte de gases y regulación del pH ya que muy pocos cursos de bioquímica incluyen este tema. Se revisó y puso al día cada capítulo con inclusión de abundante información nueva y eliminación de algún material.

El contenido de la quinta edición (cuarta en español) se divide en cinco secciones, en la que se agrupan temas relacionados. La **Parte I, Estructura de macromoléculas**, contiene un capítulo de introducción sobre la estructura celular, seguido por capítulos sobre estructura de ácidos nucleicos y proteínas. La **Parte II, Transmisión de la información**, describe la síntesis de las principales macromoléculas celulares es decir, DNA, RNA y proteínas. Se incluye un capítulo sobre biotecnología ya que la información proveniente de este área ha tenido un impacto de gran significación sobre el desarrollo de nuestra base actual de conocimientos. La Parte II concluye con un capítulo sobre la Regulación de la Expresión Génica en la que se presentan mecanismos tanto de procariotas como de eucariotas. La **Parte III, Funciones de proteínas**, se inicia con una presentación de la relación estructura-función de cuatro familias principales de proteínas. Éste es seguido por una discusión sobre los enzimas incluyéndose un capítulo separado para los citocromos P450. La Parte III concluye con una presentación de la estructura y función de membranas. La **Parte IV, Rutas metabólicas y su control**, empieza con una discusión de la bioenergética seguida por capítulos separados sobre la síntesis y degradación de glúcidos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos purínicos y pirimidínicos. Esta parte se completa con un capítulo sobre la integración de estas rutas en humanos. La **Parte V, Procesos fisiológicos**, cubre aquellas áreas propias de células y tejdidos de mamíferos empezando con dos capítulos sobre hormonas que ponen de relieve sus funciones bioquímicas en tanto que mensajeros y un capítulo sobre biología molecular de la célula que contiene una discusión sobre los cuatro sistemas transductores de señales más importantes. El libro de texto concluye con presentaciones del metabolismo del hierro y del hemo, digestión y absorción de los constituyentes nutricionales básicos y principios de nutrición humana.

Las **ilustraciones** se ha revisado y puesto al día en los casos que era necesario y se han añadido muchas figuras nuevas entre las que se incluyen una serie de estructuras proteicas publicadas recientemente. El dicho "una figura vale mil palabras" es totalmente adecuado y animamos al lector a estudiar las ilustraciones ya que se han incluido para clarificar aspectos confusos de un tema.

En cada capítulo se presenta la pertinencia del tema a procesos de la vida humana en las **Aplicaciones clínicas** que describen la bioquímica aberrante de los estados patológicos. En los últimos años se han documentado las bases genéticas y bioquímicas de muchas enfermedades por lo que se han incluido diversas aplicaciones nuevas. No se ha intentado una revisión de todas las enfermedades principales sino más bien presentar ejemplos de procesos patológicos en los que están bien establecidas las ramificaciones de los procesos bioquímicos afectados. En las aplicaciones se incluyen referencias para facilitar la exploración del tema en mayor detalle. En algunos casos se presentan problemas clínicos similares en diferentes capítulos, si bien cada uno desde una perspectiva diferente. Toda la información bioquímica pertinente se presenta en el texto principal por lo que la comprensión del material no requiere una lectura de las aplicaciones. En algunos casos se discuten condiciones clínicas como parte del texto principal debido a la significación de la enfermedad para un conocimiento del proceso bioquímico.

Cada capítulo concluye con un conjunto de **Preguntas y respuestas**. Se ha mantenido el formato de elección múltiple debido a que es útil para que los estudiantes autoevalúen su conocimiento y porque son del tipo utilizado en los exámenes nacionales en los Estados Unidos. Se han añadido preguntas nuevas que incluyen aspectos clínicos así como preguntas para la resolución de problemas. Se acompañan respuestas breves comentadas.

El apéndice, **Repaso de química orgánica**, está diseñado como una referencia rápida para la nomenclatura y estructuras de las moléculas orgánicas encontradas en la bioquímica y su finalidad no es la de ser una revisión exhaustiva de la química orgánica. El material se presenta en el Apéndice y no al principio de los capítulos que tratan de las diferentes moléculas biológicamente importante. El lector debería familiarizarse con el contenido del Apéndice para utilizarlo seguidamente como una referencia rápida al leer secciones relacionadas en el texto principal.

Continuamos creyendo que un **libro de texto con múltiples autores** es la mejor aproximación para conseguir una presentación precisa y actualizada de la bioquímica. Cada autor está implicado de forma activa en la enseñanza de la bioquímica en una facultad de medicina y tiene unos intereses investigadores en el campo sobre el que él o ella han escrito su contribución. Así, cada uno tiene la perspectiva del enseñante de clase con la experiencia necesaria para seleccionar los temas y determinar el énfasis requerido para estudiantes de un curso de bioquímica. Cada autor, sin embargo, aporta al libro un enfoque individual lo que lleva a algunas diferencias de presentación. No obstante, se ha editado cada capítulo para que haya un estilo de escritura consistente y para evitar repeticiones innecesarias y redundancias. La presentación de algunos temas, tales como la estructura de las proteínas de unión al DNA, se incluyen en dos capítulos diferentes con el fin de que la discusión individual sea completa y autosuficiente; en estos casos los autores individuales enfocan el tema desde diferentes perspectivas. La repetición debería facilitar el proceso de aprendizaje.

Los autores han preparado sus capítulos para un **libro de enseñanza**. El libro de texto no se ha concebido como un compendio de hechos bioquímicos o una revisión de la bibliografía actual aunque cada capítulo contiene, sin embargo, suficiente detalle sobre el tema para que sea una fuente útil. Se pidió a los autores que no citaran investigadores específicos; nuestras disculpas a los muchos científicos que han realizado aportaciones importantes en el campo de la bioquímica. Cada capítulo contiene una **Bibliografía** que sirve como punto de entrada para la literatura de investigación.

En todo proyecto una persona ha de aceptar la responsabilidad sobre el producto final. Las decisiones que conciernen a la selección de temas, revisión de borradores y la responsabilidad por las comprobaciones finales del libro son enteramente mías. Acogeré gustosamente todos los comentarios, críticas y sugerencias de estudiantes, profesores y profesionales que utilicen este libro de texto. Es nuestra esperanza que este libro sea útil a aquéllos que se embarcan en la fascinante experiencia de aprender la bioquímica por primer vez así como para aquéllos que vuelven a un tema sobre el que la información crece tan rápidamente.

THOMAS M. DEVLIN

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no habría visto la luz sin el estímulo y participación de muchas personas. Mi personal y profundo agradecimiento a cada uno de los autores por aceptar el desafío de preparar los capítulos, por compartir sus ideas y sugerir mejoras, por aceptar de buen grado las modificaciones a sus contribuciones y por cooperar durante todo el período de preparación del texto. Reitero mi agradecimiento a todos ellos por el trabajo bien hecho.

Los autores recibieron el apoyo de colaboradores y estudiantes en la preparación de sus respectivos capítulos, pero, para evitar la omisión de alguno de ellos, decidimos no nombrarlos individualmente. A todos los que cedieron desinteresadamente su tiempo y participaron en la evaluación objetiva y crítica del texto, les damos sinceramente las gracias. Además, cada autor debe sus conocimientos a antiguos maestros y colegas, a muchos libros y, por supuesto, a la bibliografía científica de la bioquímica; estamos en deuda con todas estas fuentes de inspiración

Estoy particularmente agradecido al Dr. Frank Vella, Profesor de Bioquímica en la University of Saskatchewan, Canadá, quien me ayudó en la corrección del texto. El Dr. Vella es un distinguido bioquímico que ha realizado un importante esfuerzo personal para mejorar la enseñanza de la bioquímica en todo el mundo. Él leyó un borrador de todos los capítulos e hizo importantes sugerencias para aclarar distintos temas y mejorar su presentación. A él, mi más profundo aprecio y agradecimiento por su participación y amistad.

También debo agradecer muy especialmente a la Dra. Carol Angstadt, amiga y colega, quien revisó muchos capítulos y me hizo valiosas sugerencias. Nuestro agradecimiento también al Dr. Harry F. Noller, de la University of California en Santa Cruz, por su generosidad al permitirnos utililizar sus figuras sobre la estructura del ribosoma en la cubierta de este libro.

Quiero extender mi agradecimiento a los miembros del equipo de la STM Division de la John Wiley & Sons que participaron en la preparación de esta edición. Mi gratitud a la Dra. Darla Henderson, Editora de Química y Bioquímica, quien dirigió concienzudamente la planificación de esta edición y me hizo valiosas sugerencias. Ella ha sido para mí un constante apoyo. Muchas gracias a Amy Romano, Editorial Program Assistant, quien manejó eficazmente los detalles administrativos y mis peticiones. Mi aprecio a Janet Bailey, Executive Publisher, por su inestimable apoyo a este proyecto. Estoy en deuda con Kristin Cooke Fasano, Associate Managing Editor, quien paciente y meticulosamente supervisó toda la producción. Kristin me mantuvo bien informado, se ocupó de muchos detalles, escuchó pacientemente mis sugerencias y puntos de vista y nos mantuvo dentro de los plazos establecidos. Fue un verdadero placer trabajar con una profesional realmente bien informada y meticulosa; sinceramente, gracias. Un reconocimiento especial para John Sollami, Senior Managing Editor y amigo, quien dirigió la producción de la 4ª edición y fue un colaborador entusiasta de esta 5ª edición; deseo a John lo mejor en su nuevo cargo.

Mi agradecimiento sincero y gratitud se extiende a Dean Gonzalez, Ilustration Manager. Deam supervisó la preparación y revisión del material gráfico, y muchas veces él mismo hizo correcciones para acelerar la producción. Mi aprecio a Camille Pecoul Carter, Director, Books Production and Manufacturing, por su apoyo constante. Gracias a J. C. Morgan y al equipo de Precision Graphics, quienes prepararon las ilustraciones. El excelente diseño del libro es fruto del trabajo de Laura Ierardi, Diseñadora, a quien extiendo mi agradecimiento. Mi reconocimiento a Christina Della Bartolomea, Correctora de pruebas, y Alexandra Nickerson, responsable de los índices; ambas hicieron un excelente trabajo. Tres personas merecen un reconocimiento especial por su esfuerzo en la presentación de este libro en la Web: mi agradecimiento se extiende a Kimi Sugueno, Senior manager, Online Book Production, Colleen Finley, Web Development Manager, y Eileen Dolan, Director Interscience Development. Ningún libro tiene éxito sin las actividades del Departamento de Marketing; un reconocimiento especial a Greg Giblin, Director of Marketing, a Adam Kirszner, Marketing Manager, y a sus colaboradores en Wiley por sus ideas y esfuerzos.

Finalmente, un especial agradecimiento para mi amada y considerada esposa, Marjorie, quien hace muchos años tuvo la providencia de animarme a emprender la preparación de un libro de texto, me apoyó durante los días de intenso trabajo y creó el ambiente necesario para que yo pudiera dedicarme a este libro durante las muchas horas que requiere su preparación. A ella, mi más profundo aprecio.

THOMAS M. DEVLIN

ÍNDICE ABREVIADO

PARTE I | ESTRUCTURA DE LAS MACROMOLÉCULAS 1

1 ESTRUCTURA CELULAR EUCARIÓTICA 3

2 DNA Y RNA: COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA 27

3 PROTEÍNAS I: COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA 93

PARTE II | TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN 159

4 REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA 161

5 RNA: TRANSCRIPCIÓN Y MADURACIÓN DEL RNA 207

6 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS: TRADUCCIÓN Y MODIFICACIONES POSTRADUCCIÓN 233

7 DNA RECOMBINANTE Y BIOTECNOLOGÍA 279

8 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA 329

PARTE III | FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS 365

9 PROTEÍNAS II: RELACIÓN ESTRUCTURA – FUNCIÓN DE FAMILIAS DE PROTEÍNAS 367

10 ENZIMAS: CLASIFICACIÓN, CINÉTICA Y CONTROL 413

11 LOS CITOCROMOS P450 Y LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS 465

12 MEMBRANAS BIOLÓGICAS: ESTRUCTURA Y TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS 493

PARTE IV | RUTAS METABÓLICAS Y SU CONTROL 535

13 BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO OXIDATIVO 537

14 METABOLISMO GLUCÍDICO I: PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS Y SU CONTROL 597

15 METABOLISMO GLUCÍDICO II: RUTAS ESPECIALES Y GLUCONJUGADOS 665

16 METABOLISMO LIPÍDICO I: UTILIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE ENERGÍA EN FORMA DE LÍPIDOS 693

17 METABOLISMO LIPÍDICO II: RUTAS METABÓLICAS DE LÍPIDOS ESPECIALES 727

18 METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS 779

19 METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS Y PIRIMIDÍNICOS 825

20 INTERRELACIONES METABÓLICAS 861

PARTE V | PROCESOS FISIOLÓGICOS 903

21 BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS I: HORMONAS POLIPEPTÍDICAS 905

22 BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS II: HORMONAS ESTEROIDES 959

23 BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA 989

24 METABOLISMO DEL HIERRO Y DEL HEMO 1053

25 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LOS CONSTITUYENTES BÁSICOS DE LA NUTRICIÓN 1081

26 PRINCIPIOS DE NUTRICIÓN I: MACRONUTRIENTES 1117

27 PRINCIPIOS DE NUTRICIÓN II: MICRONUTRIENTES 1137

APÉNDICE

REPASO DE QUÍMICA ORGÁNICA 1169

ÍNDICE ANALÍTICO

PARTE I ESTRUCTURA DE LAS MACROMOLÉCULAS 1

1 ESTRUCTURA CELULAR EUCARIÓTICA 3

Thomas M. Devlin

1.1 VISIÓN GENERAL: CÉLULAS Y COMPATIMIENTOS CELULARES 4

1.2 MEDIO CELULAR: AGUA Y SOLUTOS 6

1.3 ORGANIZACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS 14

1.4 PAPEL FUNCIONAL DE LOS ORGÁNULOS SUBCELULARES Y DE LAS MEMBRANAS 16

1.5 INTEGRACIÓN Y CONTROL DE LAS FUNCIONES CELULARES 23

BIBLIOGRAFÍA 24

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 24

APLICACIONES CLÍNICAS

- 1.1 Concentración de bicarbonato en sangre en la acidosis metabólica 13
- 1.2 Enfermedades mitocondriales 19
- 1.3 Enzimas lisosomales y gota 20
- 1.4 Carencia de lipasa ácida lisosomal 21
- 1.5 Anomalías de la biogénesis de peroxisomas 22
- 1.6 Apoptosis: muerte celular programada 23

2 DNA Y RNA: COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA 27

Stephen A. Woski y Francis J. Schmidt

2.1 VISIÓN GENERAL DEL DNA 28

2.2 COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: BASES, NUCLEÓSIDOS Y NUCLEÓTIDOS 29

2.3 ESTRUCTURA DEL DNA 33

2.4 ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR DEL DNA 58

2.5 SECUENCIA Y FUNCIÓN DEL DNA 71

2.6 VISIÓN GENERAL DEL RNA 77

2.7 ESTRUCTURA DEL RNA 78

2.8 TIPOS DE RNA 82

BIBLIOGRAFÍA 89

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 89

APLICACIONES CLÍNICAS

- 2.1 Vacunas de DNA 29
- 2.2 Uso diagnóstico de los chips de DNA en medicina y genética 45
- 2.3 Antibióticos antitumorales que cambian la forma del DNA 49
- 2.4 Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal 54
- 2.5 La telomerasa como diana de agentes anticancerígenos 56
- 2.6 Expansión de tripletes repetidos y enfermedades humanas 58
- 2.7 Uso de las topoisomerasas en el tratamiento de enfermedades 65
- 2.8 Resistencia de los estafilococos a la eritromicina 84

3 PROTEÍNAS I: COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA 93

Richard M. Schultz y Michael N. Liebman

3.1 PAPELES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS EN LOS SERES HUMANOS 94

3.2 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS 95

3.3 CARGA Y PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS Y LAS PROTEINAS 101

3.4 ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS PROTEÍNAS 109

3.5 NIVELES SUPERIORES DE ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS 112

3.6 OTROS TIPOS DE PROTEÍNAS 121

3.7 PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS EN ESTRUCTURAS ÚNICAS A PARTIR DE ESTRUCTURAS ESTADÍSTICAS: ESTABILIDAD PROTEICA 132

3.8 ASPECTOS DINÁMICOS DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS 139

3.9 MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y LA ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS 140

BIBLIOGRAFÍA 154

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 155

APLICACIONES CLÍNICAS

- 3.1 Las proteínas plasmáticas en el diagnóstico médico 107
- 3.2 Diferencias en la estructura primaria de las insulinas utilizadas en el tratamiento de la diabetes mellitus 111
- 3.3 En la anemia falciforme se produce una mutación no conservadora 112
- 3.4 Síntomas de las enfermedades relacionadas con una síntesis anormal de colágeno 121
- 3.5 Hiperlipidemias 127
- 3.6 Hipolipoproteinemias 128
- 3.7 Hemoglobina glucosilada HbA_{1c} 132

3.8 Las proteínas como agentes infecciosos: Las encefalopatías espongiformes (TSE) transmisibles humanas 134
3.9 Uso del análisis de aminoácidos en el diagnóstico médico 146

PARTE II TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN 159

4 REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA 161

Howard J. Edenberg

4.1 CARACTERÍSTICAS COMUNES DE LA REPLICACIÓN, LA RECOBINACIÓN Y LA REPARACIÓN 162
4.2 REPLICACIÓN DEL DNA 162
4.3 RECOMBINACIÓN 186
4.4 REPARACIÓN 191
BIBLIOGRAFÍA 204
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 204
APLICACIONES CLÍNICAS
4.1 Las topoisomerasas como dianas farmacológicas 175
4.2 El cáncer y el ciclo celular 180
4.3 Los análogos de los nucleósidos y la resistencia a los fármacos en la terapia contra el VIH 184
4.4 El Proyecto Genoma Humano 185
4.5 Medicina genómica 186
4.6 Terapia génica 191
4.7 Xeroderma pigmentoso 196
4.8 Reparación de apareamientos incorrectos y cáncer 198

5 RNA: TRANSCRIPCIÓN Y MADURACIÓN DEL RNA 207

Francis J. Schmidt

5.1 VISIÓN GENERAL 208
5.2 MECANISMOS DE LA TRANSCRIPCIÓN 208
5.3 LA TRANSCRIPCIÓN EN LOS EUCARIOTAS 214
5.4 MADURACIÓN DEL RNA 220
5.5 EXPORTACIÓN DEL RNA DEL NÚCLEO 228
5.6 REPARACIÓN DEL DNA ACOPLADA A LA TRANSCRIPCIÓN 228
5.7 NUCLEASAS Y RECAMBIO DEL RNA 229
BIBLIOGRAFÍA 230
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 230
APLICACIONES CLÍNICAS
5.1 Antibióticos y toxinas que interfieren con la RNA polimerasa 211
5.2 Síndrome del cromosoma X frágil: ¿Una enfermedad de la cromatina? 215
5.3 Intervención de factores de transcripción en la carcinogénesis 217
5.4 La talasemia es debida a defectos en la síntesis del RNA mensajero 224
5.5 Autoinmunidad en las enfermedades del tejido conjuntivo 225
5.6 Síndrome de Cockayne: Transcripción acoplada a la reparación del DNA 229

6 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS: TRADUCCIÓN Y MODIFICACIONES POSTRADUCCIÓN 233

Dohn Glitz

6.1 VISIÓN GENERAL 234
6.2 COMPONENTES DEL APARATO DE TRADUCCIÓN 234
6.3 BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS 245
6.4 MADURACIÓN DE LAS PROTEÍNAS: PLEGAMIENTO, MODIFICACIÓN, SECRECIÓN Y DESTINO 255
6.5 DESTINO A MEMBRANAS Y ORGÁNULOS 262
6.6 OTRAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS 265
6.7 REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN 271
6.8 DEGRADACIÓN Y RECAMBIO DE PROTEÍNAS 272
BIBLIOGRAFÍA 274
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 275
APLICACIONES CLÍNICAS
6.1 Mutaciones de cambio de sentido: la hemoglobina 238
6.2 Enfermedades relacionadas con los codones de terminación 238
6.3 α-Talasemia 239
6.4 Cambio programado del marco de lectura en la biosíntesis de las proteínas del VIH 241
6.5 La mutación del RNA ribosómico mitocondrial causa la sordera inducida por antibióticos 254
6.6 Deleción de un codón, modificación postraducción incorrecta y degradación proteica prematura: fibrosis quística 256
6.7 Plegamiento defectuoso y agregación: enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de las vacas locas, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington 257
6.8 Enfermedad de las células I 263
6.9 Hiperproinsulinemia familiar 266
6.10 Ausencia de modificaciones postraducción: deficiencia múltiple de sulfatasas 267
6.11 Defectos de la síntesis del colágeno 270

7 DNA RECOMBINANTE Y BIOTECNOLOGÍA 279

Gerald Soslau

7.1 VISIÓN GENERAL 280
7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA 281
7.3 ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y MAPAS DE RESTRICCIÓN 282
7.4 SECUENCIACIÓN DE DNA 284
7.5 DNA RECOMBINANTE Y CLONACIÓN 287
7.6 SELECCIÓN DE UN DNA ESPECÍFICO CLONADO EN LAS GENOTECAS 293
7.7 TÉCNICAS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A DNA 296
7.8 DNA COMPLEMENTARIO Y GENOTECAS DE DNA COMPLEMENTARIO 302
7.9 VECTORES DE CLONACIÓN EN BACTERIÓFAGOS, CÓSMIDOS Y LEVADURAS 305

7.10 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE FRAGMENTOS LARGOS DE DNA 307
7.11 VECTORES DE EXPRESIÓN Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN 309
7.12 VECTORES DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS 310
7.13 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA 312
7.14 APLICACIONES DE LAS TECNOLOGÍAS DEL DNA RECOMBINANTE 318
7.15 TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AL ANIMAL ENTERO 321
7.16 CONSIDERACIONES FINALES 323
BIBLIOGRAFÍA 324
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 325
APLICACIONES CLÍNICAS
7.1 Reacción en cadena de la polimerasa 282
7.2 Mapas de restricción y evolución 284
7.3 Secuenciación directa de DNA para el diagnóstico de enfermedades genéticas 287
7.4 Análisis por PCR múltiple de los defectos del gen de la *HGPRTasa* en el síndrome de Lesch–Nyhan 293
7.5 Los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción manifiestan el origen clonal de los tumores 299
7.6 Aplicación de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla para la detección de mutaciones espontáneas que pueden causar el SIDS 300
7.7 Mutagénesis dirigida del HSV I gD 315
7.8 En la terapia génica se introducen genes normales en células con genes defectuosos 320
7.9 Modelos de animales transgénicos 322
7.10 Los ratones genosuprimidos definen el papel del purinorreceptor $P2Y_1$ 323

8 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA 329
Daniel L. Weeks y John E. Donelson
8.1 VISIÓN GENERAL 330
8.2 LA UNIDAD DE TRANSCRIPCIÓN EN LAS BACTERIAS: EL OPERÓN 330
8.3 EL OPERÓN LACTOSA DE *E. COLI* 332
8.4 EL OPERÓN TRIPTÓFANO DE *E. COLI* 338
8.5 OTROS OPERONES BACTERIANOS 343
8.6 TRANSPOSONES BACTERIANOS 345
8.7 EXPRESIÓN GÉNICA EUCARIÓTICA 347
8.8 EL COMPLEJO DE PREINICIACIÓN EN LOS EUCARIOTAS: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, RNA POLIMERASA Y DNA 350
8.9 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EUCARIÓTICA 357
BIBLIOGRAFÍA 361
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 361
APLICACIONES CLÍNICAS
8.1 Resistencia transmisible a múltiples fármacos 346
8.2 Síndrome de Rubinstein-Taybi 349
8.3 Unión del tamoxifeno a los receptores de los estrógenos 358
8.4 Factores de transcripción y enfermedades cardiovasculares 359

PARTE III FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS 365

9 PROTEÍNAS II: RELACIÓN ESTRUCTURA – FUNCIÓN DE FAMILIAS DE PROTEÍNAS 367
Richard M. Schultz y Michael N. Liebman
9.1 VISIÓN GENERAL 368
9.2 MOLÉCULAS DE ANTICUERPO: LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS 368
9.3 PROTEÍNAS CON UN MECANISMO CATALÍTICO COMÚN: SERINA PROTEASAS 379
9.4 PROTEÍNAS DE UNIÓN A DNA 387
9.5 HEMOGLOBINA Y MIOGLOBINA 393
BIBLIOGRAFÍA 409
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 410
APLICACIONES CLÍNICAS
9.1 Proteínas del sistema del complemento 371
9.2 Funciones de las diferentes clases de anticuerpos 372
9.3 Inmunización 372
9.4 Formación de fibrina en el infarto de miocardio y acción del activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA) 378
9.5 Participación de las serina proteasas en la metástasis celular tumoral 379
9.6 Hemoglobinopatías 394

10 ENZIMAS: CLASIFICACIÓN, CINÉTICA Y CONTROL 413
J. Lyndal York
10.1 CONCEPTOS GENERALES 414
10.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS 415
10.3 CINÉTICA 418
10.4 COENZIMAS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN 426
10.5 INHIBICIÓN DE LOS ENZIMAS 431
10.6 CONTROL ALOSTÉRICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 436
10.7 ESPECIFICIDAD ENZIMÁTICA: EL CENTRO ACTIVO 440
10.8 MECANISMO DE CATÁLISIS 443
10.9 APLICACIONES CLÍNICAS DE LOS ENZIMAS 452
10.10 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 459
BIBLIOGRAFÍA 460
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 460
APLICACIONES CLÍNICAS
10.1 Un caso de gota demuestra la existencia de dos fases en el mecanismo de acción enzimático 423
10.2 Efecto fisiológico de las variaciones en el valor de la K_m de un enzima 423
10.3 La mutación en un centro de fijación de un coenzima da lugar a una enfermedad clínica 426
10.4 Diseño de un inhibidor selectivo 432
10.5 Un caso de envenenamiento 435
10.6 Un caso de gota demuestra la diferencia entre un centro alostérico y el centro de fijación de sustrato 437

10.7 La labilidad térmica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa produce anemia hemolítica 451
10.8 Isozimas de la alcohol deshidrogenasa con diferente pH óptimo 452
10.9 Identificación y tratamiento de una deficiencia enzimática 454
10.10 Ambigüedad en el análisis de enzimas mutados 454

11 LOS CITOCROMOS P450 Y LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS 465

Richard T. Okita y Bettie Sue Siler Masters

11.1 VISIÓN GENERAL 466
11.2 CITOCROMO P450: CLASIFICACIÓN GENERAL Y DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN GLOBAL 466
11.3 SISTEMAS DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO DEL CITOCROMO P450 468
11.4 CITOCROMO P450: NOMENCLATURA Y TERMINOLOGÍA 470
11.5 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LOS CITOCROMOS P450: FUNCIONES FISIOLÓGICAS 471
11.6 INHIBIDORES DE LOS CITOCROMOS P450 480
11.7 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CITOCROMO P450 482
11.8 OTRAS OXIGENACIONES MEDIADAS POR HEMOPROTEÍNAS Y FLAVOPROTEÍNAS: CITOCROMOS P450 SOLUBLES Y ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS 486

BIBLIOGRAFÍA 489

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 489

APLICACIONES CLÍNICAS

11.1 Hiperplasia adrenal congénita: Deficiencia de CYP21A2 474
11.2 Producción de hormonas esteroides durante el embarazo 475
11.3 Papel del citocromo P450 2E1 en la toxicidad hepática inducida por paracetamol 480
11.4 Consecuencias de la inhibición del P450: Interacciones entre fármacos y efectos adversos 481
11.5 Consecuencias de la inducción de enzimas P450 484
11.6 Polimorfismos genéticos de enzimas P450 485
11.7 Aspectos clínicos de la producción de óxido nítrico 487

12 MEMBRANAS BIOLÓGICAS: ESTRUCTURA Y TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS 493

Thomas M. Devlin

12.1 VISIÓN GENERAL 494
12.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MEMBRANAS 494
12.3 MICELAS Y LIPOSOMAS 502
12.4 ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS 505
12.5 MOVIMIENTO DE LAS MOLÉCULAS A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS 511
12.6 CANALES Y POROS 516
12.7 SISTEMAS DE TRANSPORTE PASIVO FACILITADO 519
12.8 SISTEMAS DE TRANSPORTE FACILITADO ACTIVO 522
12.9 IONÓFOROS 529

BIBLIOGRAFÍA 531

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 531

APLICACIONES CLÍNICAS

12.1 Los liposomas como transportadores de fármacos y enzimas 504
12.2 Anormalidades en la fluidez de las membranas celulares en estados patológicos 510
12.3 La fibrosis quística y el canal de Cl^- 517
12.4 Enfermedades debidas a la pérdida de sistemas de transporte de membrana 529

PARTE IV RUTAS METABÓLICAS Y SU CONTROL 535

13 BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO OXIDATIVO 537

Diana S. Beattie

13.1 SISTEMAS QUE PRODUCEN Y SISTEMAS QUE UTILIZAN ENERGÍA 538
13.2 RELACIONES TERMODINÁMICAS Y COMPUESTOS RICOS EN ENERGÍA 540
13.3 FUENTES Y DESTINOS DEL ACETIL COENZIMA A 547
13.4 CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS 552
13.5 ESTRUCTURA Y COMPARTIMENTACIÓN MEDIANTE LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES 561
13.6 CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO 564
13.7 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA 577
13.8 LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES INTERNAS POSEEN SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SUSTRATOS 583
13.9 GENES MITOCONDRIALES Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES 587
13.10 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) 590

BIBLIOGRAFÍA 592

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 593

APLICACIONES CLÍNICAS

13.1 Deficiencia de piruvato deshidrogenasa 552
13.2 Deficiencia de fumarasa 557
13.3 Envenenamiento por cianuro 577
13.4 Neuropatía óptica hereditaria de Leber 588
13.5 Miopatías mitocondriales debidas a mutaciones en genes de tRNA 589
13.6 Intolerancia al ejercicio en pacientes con mutaciones en el citocromo *b* 589
13.7 Lesión isquemia/reperfusión 591

14 METABOLISMO GLUCÍDICO I: PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS Y SU CONTROL 597

Robert A. Harris

14.1 VISIÓN GENERAL 598
14.2 GLUCÓLISIS 599
14.3 RUTA GLUCOLÍTICA 603
14.4 REGULACIÓN DE LA RUTA GLUCOLÍTICA 614

14.5 GLUCONEOGÉNESIS 629
14.6 GLUCOGENÓLISIS Y GLUCOGENOGÉNESIS 643
BIBLIOGRAFÍA 661
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 662
APLICACIONES CLÍNICAS
14.1 Alcohol y barbitúricos 612
14.2 Envenenamiento por arsénico 614
14.3 Intolerancia a la fructosa 616
14.4 Diabetes mellitus 618
14.5 Acidosis láctica 621
14.6 Cerdo en escabeche e hipertermia maligna 621
14.7 Angina de pecho e infarto de miocardio 622
14.8 Anemia hemolítica por déficit de piruvato quinasa 628
14.9 Hipoglucemia y niños prematuros 629
14.10 Hipoglucemia e intoxicación alcohólica 643
14.11 Enfermedades de almacenamiento del glucógeno 647

15 METABOLISMO GLUCÍDICO II: RUTAS ESPECIALES Y GLUCONJUGADOS 665
Nancy B Schwartz

15.1 VISIÓN GENERAL 666
15.2 RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO 666
15.3 INTERCONVERSIONES DE AZÚCARES Y FORMACIÓN DE AZÚCARES UNIDOS A NUCLEÓTIDO 671
15.4 BIOSÍNTESIS DE GLÚCIDOS COMPLEJOS 678
15.5 GLUCOPROTEÍNAS 679
15.6 PROTEOGLUCANOS 683
BIBLIOGRAFÍA 689
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 689
APLICACIONES CLÍNICAS
15.1 Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa: deficiencia genética o presencia de variantes genéticas en los eritrocitos 668
15.2 Síndrome de Wernicke-Korsakoff: Deficiencia o presencia de variante genéticas de la transcetolasa 670
15.3 Síndromes de glucoproteína deficiente en glúcidos (CDGS) 672
15.4 Fructosuria esencial e intolerancia a la fructosa: deficiencias de fructoquinasa y fructosa 1-fosfato aldolasa 673
15.5 Galactosemia: incapacidad de transformar la galactosa en glucosa 674
15.6 Pentosuria: déficit de xilitol deshidrogenasa 675
15.7 Ácido glucurónico: significación fisiológica de la formación de glucurónidos 675
15.8 Componentes de los grupos sanguíneos 679
15.9 Marcador glucídico común de destinación lisosómica y enfermedad de la célula I 682
15.10 Aspartilglucosilaminuria: ausencia de 4-L-aspartilglucosamina amidohidrolasa 683
15.11 Enfermedades de glucolípidos 683
15.12 La heparina es un anticoagulante 685
15.13 Condrodistrofias debidas a defectos de sulfatación 687
15.14 Mucopolisacaridosis 688

16 METABOLISMO LIPÍDICO I: UTILIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE ENERGÍA EN FORMA DE LÍPIDOS 693
J. Denis McGarry

16.1 VISIÓN GENERAL 694
16.2 NATURALEZA QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE LOS ACILGLICEROLES 695
16.3 FUENTES DE ÁCIDOS GRASOS 697
16.4 ALMACENAMIENTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN FORMA DE TRIACILGLICEROLES 706
16.5 MÉTODOS DE TRANSPORTE DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE SUS PRODUCTOS PRIMARIOS ENTRE ÓRGANOS 710
16.6 UTILIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA 713
BIBLIOGRAFÍA 723
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 723
APLICACIONES CLÍNICAS
16.1 Obesidad 709
16.2 Leptina y obesidad 710
16.3 Anormalidades genéticas en el transporte de energía en forma de lípidos 711
16.4 Deficiencias genéticas en el transporte por carnitina o en la carnitina palmitil transferasa 715
16.5 Deficiencias genéticas en las acil-CoA deshidrogenasas 716
16.6 Enfermedad de Refsum 719
16.7 Cetoacidosis diabética 721

17 METABOLISMO LIPÍDICO II: RUTAS METABÓLICAS DE LÍPIDOS ESPECIALES 727
Robert H. Glew

17.1 VISIÓN GENERAL 728
17.2 FOSFOLÍPIDOS 728
17.3 COLESTEROL 741
17.4 ESFINGOLÍPIDOS 754
17.5 PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS 766
17.6 LIPOXIGENASA Y ÁCIDOS OXI-ICOSATETRAENOICOS 770
BIBLIOGRAFÍA 774
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 775
APLICACIONES CLÍNICAS
17.1 Síndrome del dolor respiratorio 731
17.2 Tratamiento de la hipercolesterolemia 751
17.3 Aterosclerosis 752
17.4 Diagnóstico de la enfermedad de Gaucher en un adulto 765

18 METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS 779
Marguerite W. Coomes

18.1 VISIÓN GENERAL 780
18.2 INCORPORACIÓN DEL NITRÓGENO EN LOS AMINOÁCIDOS 781
18.3 TRANSPORTE DE NITRÓGENO AL HÍGADO Y RIÑÓN 786

18.4 CICLO DE LA UREA 787

18.5 SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE LOS AMINÓACIDOS INDIVIDUALES 790

BIBLIOGRAFÍA 821

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 821

APLICACIONES CLÍNICAS

18.1 Deficiencias de carbamil fosfato sintetasa y *N*-acetilglutamato sintetasa 790
18.2 Deficiencias en enzimas del ciclo de la urea 791
18.3 Hiperglicinemia no cetótica 795
18.4 Deficiencia de ácido fólico 797
18.5 Fenilcetonuria 799
18.6 Enfermedades del metabolismo de la tirosina 801
18.7 Enfermedad de Parkinson 801
18.8 Hiperhomocisteinemia y aterogénesis 805
18.9 Otras enfermedades del metabolismo de los aminoácidos sulfurados 805
18.10 Enfermedades del metabolismo de los aminoácidos ramificados 813
18.11 Enfermedades del metabolismo del propionato y del metilmalonato 814
18.12 Enfermedades que implican a la lisina y la ornitina 816
18.13 Histidinemia 816
18.14 Enfermedades del metabolismo del folato 817

19 METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS Y PIRIMIDÍNICOS 825

Joseph G. Cory

19.1 VISIÓN GENERAL 826

19.2 FUNCIONES METABÓLICAS DE LOS NUCLEÓTIDOS 826

19.3 QUÍMICA DE LOS NUCLEÓTIDOS 828

19.4 METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS 830

19.5 METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PIRIMIDÍNICOS 839

19.6 FORMACIÓN DE DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS 843

19.7 NUCLEÓSIDO Y NUCLEÓTIDO QUINASAS 848

19.8 ENZIMAS METABOLIZANTES DE NUCLEÓTIDOS EN FUNCIÓN DEL CICLO CELULAR Y DE LA VELOCIDAD DE DIVISIÓN CELULAR 848

19.9 SÍNTESIS DE COENZIMAS NUCLEOTÍDICOS 850

19.10 SÍNTESIS Y UTILIZACIÓN DEL 5-FOSFORRIBOSIL-1-PIROFOSFATO 853

19.11 COMPUESTOS QUE OBSTACULIZAN EL METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS Y PIRIMIDÍNICOS: SU UTILIZACIÓN COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS 854

BIBLIOGRAFÍA 858

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 858

APLICACIONES CLÍNICAS

19.1 Gota 834
19.2 Síndrome de Lesch–Nyhan 836
19.3 Actividad 5′-nucleotidasa citosólica incrementada 839
19.4 Enfermedades inmunodeficientes asociadas con defectos en la degradación de los nucleótidos purínicos 839
19.5 Pacientes de cáncer que están sujetos a radiación o a tratamiento quimioterápico 840
19.6 Subclase de pacientes con autismo 840
19.7 Aciduria orótica hereditaria 842

20 INTERRELACIONES METABÓLICAS 861

Robert A. Harris y David W. Crabb

20.1 VISIÓN GENERAL 862

20.2 CICLO AYUNO–ALIMENTACIÓN 864

20.3 MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CONMUTACIÓN DEL METABOLISMO HEPÁTICO ENTRE LOS ESTADOS DE BUENA NUTRICIÓN Y DE INANICIÓN 876

20.4 INTERRELACIONES METABÓLICAS DE LOS TEJIDOS EN DIVERSOS ESTADOS NUTRICIONALES Y HORMONALES 885

BIBLIOGRAFÍA 899

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 900

APLICACIONES CLÍNICAS

20.1 Obesidad 862
20.2 Malnutrición proteica 863
20.3 Inanición 863
20.4 Síndrome de Reye 869
20.5 Coma hiperosmolar hiperglucémico 874
20.6 Hiperglucemia y glucosilación de proteínas 875
20.7 Diabetes mellitus tipo 2 (no dependiente de insulina) 887
20.8 Diabetes mellitus tipo 1 (dependiente de insulina) 888
20.9 Complicaciones de la diabetes y ruta de los polioles 889
20.10 Caquexia cancerosa 893

PARTE V PROCESOS FISIOLÓGICOS 903

21 BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS I: HORMONAS POLIPEPTÍDICAS 905

Gerald Litwack y Thomas J. Schmidt

21.1 VISIÓN GENERAL 906

21.2 HORMONAS Y SISTEMA DE CASCADA HORMONAL 907

21.3 HORMONAS POLIPEPTÍDICAS PRINCIPALES Y SU ACCIÓN 912

21.4 GENES Y FORMACIÓN DE HORMONAS POLIPEPTÍDICAS 915

21.5 SÍNTESIS DE HORMONAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS 919

21.6 INACTIVACIÓN Y DEGRADACIÓN DE HORMONAS 923

21.7 REGULACIÓN CELULAR Y SECRECIÓN HORMONAL 925

21.8 SISTEMAS CÍCLICOS DE CASCADA HORMONAL 931

21.9 INTERACCIONES HORMONA–RECEPTOR 936

21.10 ESTRUCTURA DE RECEPTORES: EL RECEPTOR β-ADRENÉRGICO 940

21.11 INTERNALIZACIÓN DE RECEPTORES 941

21.12 ACCIÓN INTRACELULAR: PROTEÍNA QUINASAS 943

21.13 ONCOGENES Y FUNCIONES DE LOS RECEPTORES 952

BIBLIOGRAFÍA 955

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 955

APLICACIONES CLÍNICAS

21.1 Ensayos de la actividad de la hipófisis anterior 910
21.2 Hipopituitarismo 912
21.3 Tratamiento de la enfermedad maníaco depresiva con litio: ciclo del fosfatidilinositol 931
21.4 Disminución de la actividad quinasa del receptor de la insulina en la diabetes mellitus gestacional 946
21.5 Avances en la quimioterapia del cáncer de mama 955

22 BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS II: HORMONAS ESTEROIDES 959

Gerald Litwack y Thomas J. Schmidt

22.1 VISIÓN GENERAL 960
22.2 ESTRUCTURA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES 960
22.3 BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES 963
22.4 MINACTIVACIÓN METABÓLICA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES 967
22.5 COMUNICACIÓN INTRACELULAR Y CONTROL DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES 967
22.6 TRANSPORTE DE HORMONAS ESTEROIDES EN LA SANGRE 973
22.7 RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES 974
22.8 ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES: REGULACIÓN POSITIVA Y REGULACIÓN NEGATIVA 982
22.9 EJEMPLOS ESPECÍFICOS DE LA ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES A NIVEL CELULAR: MUERTE PROGRAMADA 985

BIBLIOGRAFÍA 986

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 986

APLICACIONES CLÍNICAS

22.1 Contracepción oral 972
22.2 Síndrome del exceso aparente de mineralocorticoides 977
22.3 La mutación del receptor de mineralocorticoides produce la hipertensión y toxemia del embarazo 984
22.4 Muerte celular programada en el ciclo ovárico 985

23 BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA 989

Thomas E. Smith

23.1 VISIÓN GENERAL 990
23.2 TEJIDO NERVIOSO: METABOLISMO Y FUNCIÓN 990
23.3 EL OJO: METABOLISMO Y VISIÓN 1002
23.4 CONTRACCIÓN MUSCULAR 1016
23.5 MECANISMO DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA 1031

BIBLIOGRAFÍA 1049

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 1050

APLICACIONES CLÍNICAS

23.1 Síndrome miasténico de Lambert–Eaton 997
23.2 Miastenia grave: una disfunción neuromuscular 999
23.3 Degeneración de la mácula y otras causas de pérdida de la visión 1006
23.4 Enfermedad de Niemann–Pick y retinitis pigmentosa 1007
23.5 Retinitis pigmentosa como resultado de una mutación en el gen de la periferina 1009
23.6 Localización cromosómica de los genes de la visión 1015
23.7 Cardiomiopatías hipertróficas familiares y mutaciones en las proteínas musculares 1019
23.8 Mutaciones en la actina y cardiomiopatía dilatada 1022
23.9 Subunidades de troponina como marcadores del infarto de miocardio 1024
23.10 Enfermedades relacionadas con los canales iónicos con compuertas de voltaje 1026
23.11 Canales iónicos y enfermedades del músculo cardíaco 1027
23.12 Defectos en la ruta intrínseca: déficit de precalicreína 1034
23.13 Hemofilia clásica 1039
23.14 Trombosis y alteraciones en la ruta de la proteína C 1044

24 METABOLISMO DEL HIERRO Y DEL HEMO 1053

William M. Awad, Jr.

24.1 METABOLISMO DEL HIERRO: VISIÓN GENERAL 1054
24.2 PROTEÍNAS QUE CONTIENEN HIERRO 1054
24.3 ABSORCIÓN INTESTINAL DEL HIERRO 1057
24.4 REGULACIÓN MOLECULAR DE LA UTILIZACIÓN DEL HIERRO 1059
24.5 DISTRIBUCIÓN Y CINÉTICA DEL HIERRO 1061
24.6 BIOSÍNTESIS DEL HEMO 1063
24.7 CATABOLISMO DEL HEMO 1071

BIBLIOGRAFÍA 1076

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 1077

APLICACIONES CLÍNICAS

24.1 Sobrecarga de hierro e infección 1055
24.2 Síntesis de grupos ferro-sulfurados y enfermedades humanas 1057
24.3 Ataxia de Friedreich 1057
24.4 Absorción de hierro en el duodeno 1058
24.5 Mutaciones en los elementos de respuesta al hierro 1060
24.6 Deficiencia de ceruloplasmina 1061
24.7 Anemia ferropénica 1062
24.8 Hemocromatosis Tipo I: genética molecular y la cuestión de las dietas ricas en hierro 1062
24.9 Hemocromatosis Tipo II 1063
24.10 Porfiria intermitente aguda 1066
24.11 Hemólisis isoinmune neonatal 1074
24.12 Deficiencia de bilirrubina-UDP-glucuronosil transferasa 1075
24.13 Aumento de la bilirrubina plasmática conjugada 1075

25 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LOS CONSTITUYENTES BÁSICOS DE LA NUTRICIÓN 1081

Ulrich Hopfer

25.1 VISIÓN GENERAL 1082
25.2 DIGESTIÓN: CONSIDERACIONES GENERALES 1084

25.3 TRANSPORTE EPITELIAL 1088
25.4 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE PROTEÍNAS 1097
25.5 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE GLÚCIDOS 1100
25.6 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS 1104
25.7 METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS BILIARES 1110
BIBLIOGRAFÍA 1112
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 1113
APLICACIONES CLÍNICAS
25.1 La cloridorrea familiar produce alcalosis metabólica 1092
25.2 Fibrosis quística 1093
25.3 Diarreas por bacterias toxigénicas y terapia de reposición de electrolitos 1094
25.4 Aminoaciduria neutra: enfermedad de Hartnup 1100
25.5 Deficiencia de disacaridasa 1103
25.6 Intervenciones farmacológicas para evitar la absorción de grasas y la obesidad 1106
25.7 Cálculos de colesterol 1109
25.8 A-β-lipoproteinemia 1110

26 PRINCIPIOS DE NUTRICIÓN I: MACRONUTRIENTES 1117

Stephen G. Chaney

26.1 VISIÓN GENERAL 1118
26.2 METABOLISMO ENERGÉTICO 1118
26.3 METABOLISMO PROTEICO 1119
26.4 MALNUTRICIÓN PROTEICA Y ENERGÉTICA 1123
26.5 EXCESO DE INGESTA PROTEICA Y ENERGÉTICA 1123
26.6 GLÚCIDOS 1125
26.7 GRASAS 1126
26.8 FIBRA 1127
26.9 COMPOSICIÓN DE MACRONUTRIENTES EN LA DIETA 1128
BIBLIOGRAFÍA 1133
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 1133
APLICACIONES CLÍNICAS
26.1 Dietas vegetarianas y necesidades proteicas y energéticas 1121
26.2 Dietas pobres en proteína y enfermedad renal 1121
26.3 Provisión de las proteínas y calorías adecuadas para el paciente hospitalizado 1123
26.4 Carga glucídica y resistencia atlética 1125
26.5 Dietas ricas en glúcidos frente a dietas ricas en grasa para diabéticos 1126
26.6 Ácidos grasos poliinsaturados y factores de riesgo en la enfermedad cardíaca 1129
26.7 Adaptación metabólica: relación entre la ingesta de glúcidos y triacilgliceroles séricos 1130

27 PRINCIPIOS DE NUTRICIÓN II: MICRONUTRIENTES 1137

Stephen G. Chaney

27.1 VISIÓN GENERAL 1138
27.2 EVALUACIÓN DE LA MALNUTRICIÓN 1138
27.3 INGESTAS DIETÉTICAS DE REFERENCIA 1138
27.4 VITAMINAS LIPOSOLUBLES 1139
27.5 VITAMINAS HIDROSOLUBLES 1148
27.6 VITAMINAS HIDROSOLUBLES LIBERADORAS DE ENERGÍA 1148
27.7 VITAMINAS HIDROSOLUBLES HEMATOPOYÉTICAS 1154
27.8 OTRAS VITAMINAS HIDROSOLUBLES 1157
27.9 MACROMINERALES 1159
27.10 OLIGOELEMENTOS 1161
27.11 LA DIETA ESTADOUNIDENSE: HECHOS Y FALACIAS 1164
27.12 EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA 1164
BIBLIOGRAFÍA 1166
PREGUNTAS Y RESPUESTAS 1167
APLICACIONES CLÍNICAS
27.1 Consideraciones nutricionales en la fibrosis quística 1142
27.2 Osteodistrofia renal 1143
27.3 Consideraciones nutricionales para el recién nacido 1147
27.4 Fármacos anticonvulsivos y necesidades vitamínicas 1148
27.5 Consideraciones nutricionales para los alcohólicos 1150
27.6 Necesidades de vitamina B_6 para los consumidores de contraceptivos orales 1153
27.7 Polimorfismos genéticos y necesidad de ácido fólico 1155
27.8 Dieta y osteoporosis 1160
27.9 Requerimientos nutricionales en personas de edad avanzada 1165

APÉNDICE

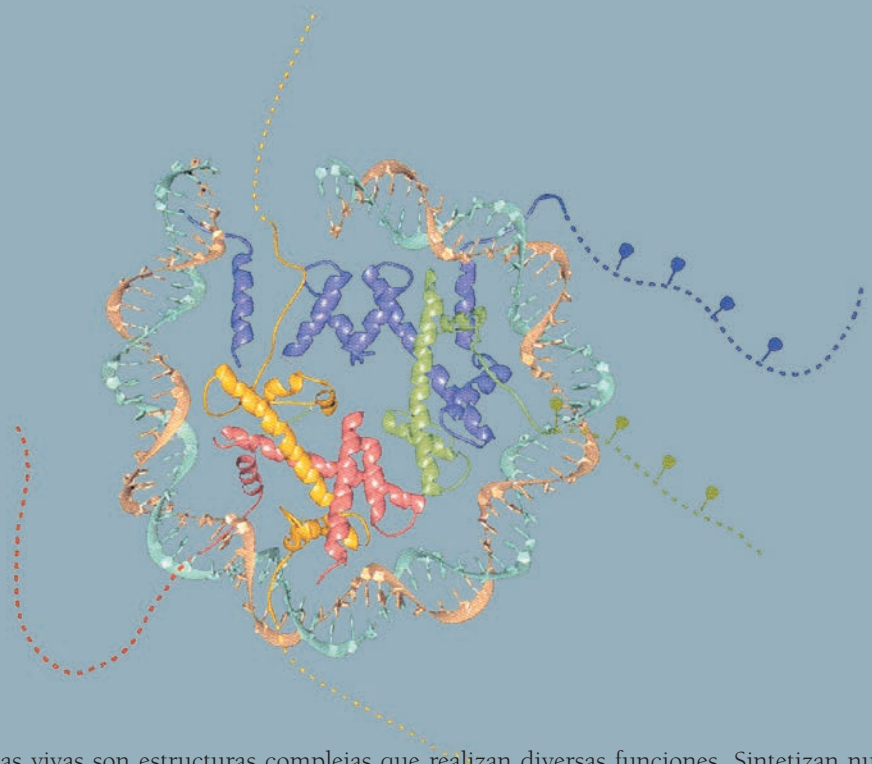
REPASO DE QUÍMICA ORGÁNICA 1169

Caron N. Angstadt

ÍNDICE ALFABÉTICO 1181

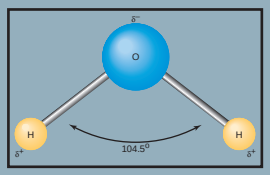
PARTE I

ESTRUCTURA DE LAS MACROMOLÉCULAS

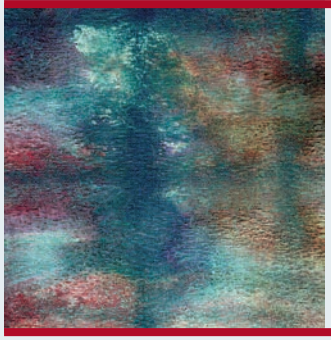


Las células vivas son estructuras complejas que realizan diversas funciones. Sintetizan numerosas moléculas pequeñas y grandes, entre ellas las denominadas macromoléculas, que son estructuras con una elevada masa molecular. Para realizar esta síntesis utilizan un número limitado de diferentes tipos de bloques de construcción. Las principales macromoléculas son el ácido desoxirribonucleico (DNA), el ácido ribonucleico (RNA) y las proteínas. La figura de arriba muestra la unión del DNA a proteínas específicas y es un ejemplo de la interacción de dos tipos diferentes de macromoléculas; los detalles se presentan en la Figura 2.48. La Parte I se centra primero en la célula y sus componentes y luego en la estructura de los ácidos nucleicos y de las proteínas. Muchas enfermedades se deben a cambios en la estructura de estas macromoléculas.

Figura reproducida de R.D. Kornberg y Y. Lorch, Cell 98:285, 1999, con autorización de los autores y Elsevier Science.



1



ESTRUCTURA CELULAR EUCARIÓTICA

Thomas M. Devlin

1.1 VISIÓN GENERAL: CÉLULAS Y COMPATIMIENTOS CELULARES 4

1.2 MEDIO CELULAR: AGUA Y SOLUTOS 6

Entre moléculas de agua se forman puentes de hidrógeno 6
El agua tiene propiedades únicas como disolvente 7
Algunas moléculas se disocian en cationes y aniones 7
Los electrolitos débiles se disocian parcialmente 8
El agua es un electrolito débil 8
Muchas moléculas biológicamente importantes son ácidos o bases 9
La ecuación de Henderson-Hasselbalch define la relación entre el pH y las concentraciones de un ácido y una base conjugados 11
La capacidad de amortiguación es importante para controlar el pH 12

1.3 ORGANIZACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS 14

Composición química de las células 15

1.4 PAPEL FUNCIONAL DE LOS ORGÁNULOS SUBCELULARES Y DE LAS MEMBRANAS 16

La membrana plasmática delimita la célula 17
La síntesis de DNA y RNA tiene lugar en el núcleo 18
El retículo endoplasmático participa en la síntesis proteica y en otras muchas rutas de síntesis 18
El aparato de Golgi participa en la secreción de proteínas 18
La mitocondrias proporcionan la mayor parte del ATP necesario para la célula 19
Los lisosomas son necesarios para la digestión intracelular 20
Los peroxisomas tienen un importante papel en el metabolismo lipídico 22
El citoesqueleto organiza el contenido intracelular 22
El citosol contiene los componentes celulares solubles 22

1.5 INTEGRACIÓN Y CONTROL DE LAS FUNCIONES CELULARES 23

BIBLIOGRAFÍA 24

PREGUNTAS 24

RESPUESTAS 25

APLICACIONES CLÍNICAS

1.1 Concentración de bicarbonato en sangre en la acidosis metabólica 13
1.2 Enfermedades mitocondriales 19
1.3 Enzimas lisosómico y gota 20
1.4 Carencia de lipasa ácida lisosómica 21
1.5 Anomalías de la biogénesis de peroxisomas 22
1.6 Apoptosis: muerte celular programada 23

1.1 VISIÓN GENERAL: CÉLULAS Y COMPARTIMIENTOS CELULARES

Hace alrededor de tres mil quinientos millones de años, en condiciones sólo en parte conocidas y en un espacio de tiempo difícil de estimar, los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo formaron compuestos químicos simples, los cuales se combinaron, dispersaron y recombinaron para formar una amplia gama de moléculas mayores hasta llegar a una estructura capaz de replicarse a sí misma. Con el tiempo se formaron moléculas cada vez más complejas, hasta que el entorno de alguna de estas moléculas autorreplicativas quedó encerrado por una membrana lipídica. Esta mejora permitió que estas estructuras primordiales controlasen en parte su propio entorno. De este modo apareció la célula como unidad fundamental de la vida. Las células evolucionaron y su química y su estructura se hicieron más complejas. Eran capaces de extraer nutrientes del entorno, de convertirlos en fuentes de energía o en moléculas complejas, de controlar los procesos químicos de la catálisis y de replicarse. Así comenzó la gran diversidad de formas de vida que contemplamos en nuestros días. La célula es la unidad vital básica en todos los organismos vivos, desde la bacteria unicelular más pequeña hasta el animal pluricelular más complejo.

Todas las células tienen una membrana exterior que las limita, la **membrana plasmática**, que delimita el espacio ocupado por la célula y separa el medio exterior, variable y potencialmente hostil, del medio relativamente constante del interior. La membrana plasmática y sus componentes constituyen el vínculo con el exterior, controlan el movimiento de sustancias hacia adentro y hacia fuera de la célula y sirven de medio de comunicación.

Las células vivas se dividen en dos grandes clases: **procarióticas**, que no tienen núcleo ni estructuras internas membranosas, y **eucarióticas**, que tienen un núcleo definido y orgánulos intracelulares rodeados de membrana. Los procariotas, que incluyen las eubacterias y las arquebacterias, son normalmente unicelulares (Figura 1.1*a*), pero en algunos casos forman colonias y filamentos. Presentan una gran variedad de formas y tamaños, pero normalmente su volumen es de 1/1000 a 1/10 000 del de las células eucarióticas. La membrana plasmática está a menudo invaginada.

El **ácido desoxirribonucleico** (DNA) de los procariotas a menudo se halla confinado en una zona restringida, la región del **nucleoide**, que no se encuentra rodeada por una membrana o envoltura. Incluso sin compartimientos definidos por membranas, el medio intracelular de los procariotas está organizado en compartimientos funcionales. Las células eucarióticas, que incluyen las de levaduras, hongos, plantas y animales, tienen una membrana bien definida que rodea el **núcleo** central y una variedad de orgánulos y estructuras intracelulares (Figura 1.1*b*). Los sistemas de membrana intracelulares definen compartimientos subcelulares diferentes, descritos en la Sección 1.4, que permiten un alto nivel de organización subcelular. Gracias a la compartimentación, diferentes reacciones químicas que requieren diferentes medios pueden ocurrir simultáneamente. Además, muchas reacciones tienen lugar en o sobre membranas específicas que crean nuevos ambientes para las diversas funciones celulares.

Además de las variaciones estructurales entre las células procarióticas y eucarióticas (Figura 1.1), hay diferencias significativas en la composición química y en las actividades bioquímicas. Por ejemplo, los eucariotas, a diferencia de los procariotas, poseen histonas, una clase de proteínas muy conservadas en los eucariotas que forman complejos con el DNA. Hay diferencias estructurales importantes en los complejos ácido ribonucleico-proteína implicados en la biosíntesis de proteínas y en el contenido enzimático de los dos tipos de células. También son sorprendentes las muchas similitudes. Este libro de texto se centra en la química de las células eucarióticas, especialmente de las células de mamíferos, pero gran parte de nuestro saber sobre la bioquímica de las células vivas proviene del estudio de células procarióticas y de las células eucarióticas de los no mamíferos. Los componentes químicos básicos y muchas de las reacciones químicas fundamentales son similares en todas las células vivas. Sin embargo, la universalidad de muchos fenómenos bioquímicos permite hacer muchas extrapolaciones de las bacterias a los humanos.

El medio intracelular, y en particular el agua que contiene, condiciona muchas de las actividades celulares. Es, pues, conveniente revisar algunas de las propieda-

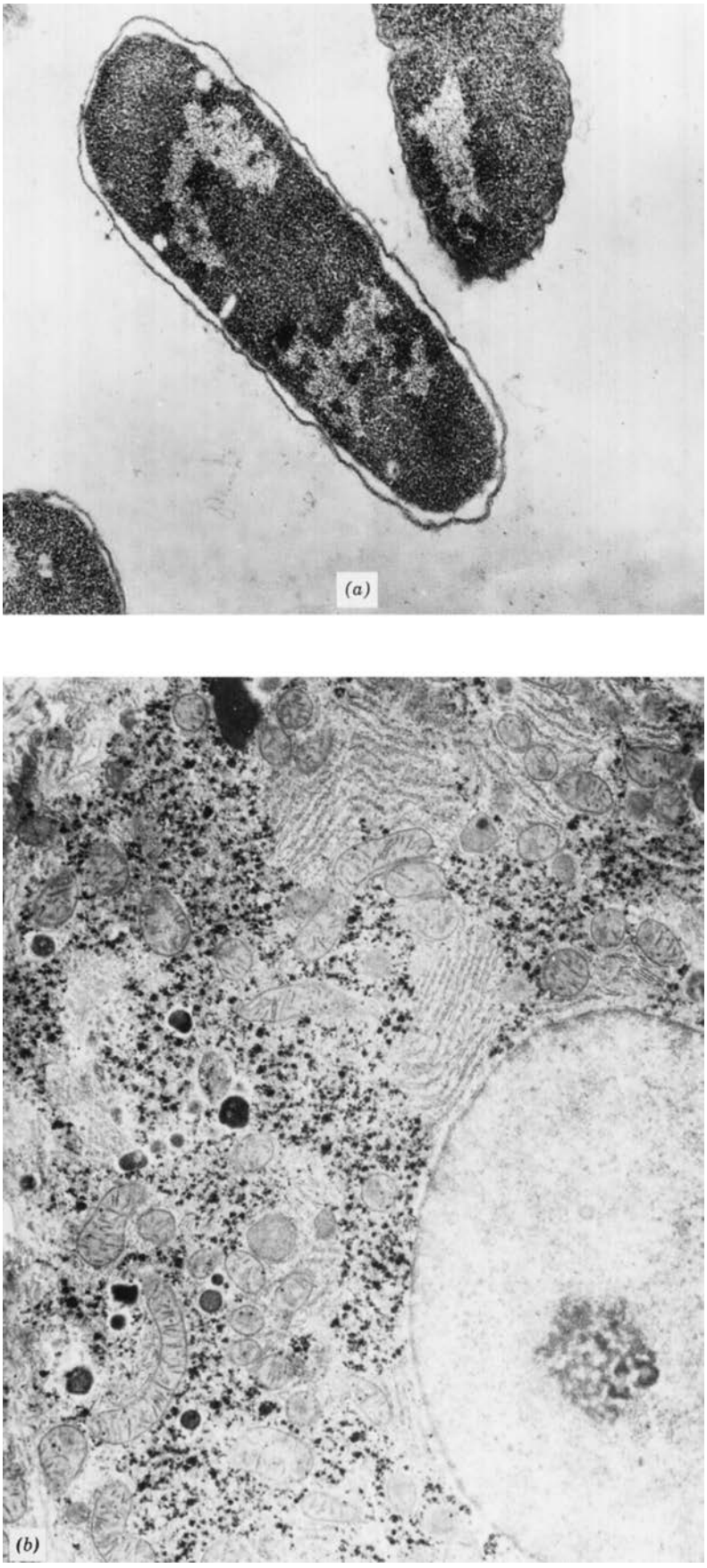


FIGURA 1.1
Organización celular de las células procarióticas y eucarióticas.
(*a*) Micrografía electrónica de *Escherichia coli*, un procariota representativo; aumento aproximado 30 000. Hay poca organización intracelular visible y no hay orgánulos citoplasmáticos. La cromatina está condensada en un zona nuclear, pero no está rodeada por una membrana. Las células procarióticas son mucho más pequeñas que las eucarióticas.
(*b*) Micrografía electrónica de una sección delgada de una célula de hígado (hepatocito de rata), representativa de las células eucarióticas; aumento aproximado, 7500. Nótese la membrana nuclear definida, la variedad de orgánulos o vesículas unidos a membranas y los vastos sistemas membranosos. Las distintas membranas crean una serie de compartimientos intracelulares.
Fotografía (a) cedida generosamente por el Dr. M. E. Bayer, Fox Chase Cancer Institute, Philadelphia, PA; fotografía (b) reproducida con el permiso del Dr. K. R. Porter, y sacada de Porter, K. R. y Bonneville, M. A. En: Fine Structure of Cells and Tissues, *Philadelphia; Lea & Febiger, 1972.*

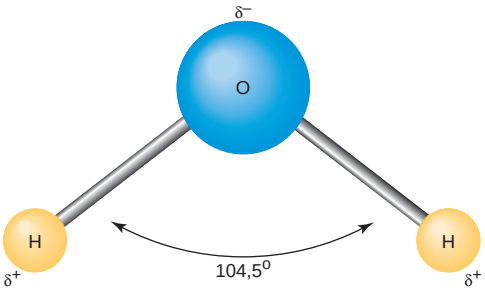


FIGURA 1.2
Estructura de la molécula de agua.
El ángulo del enlace H—O—H es 104,5°. Ambos hidrógenos tienen una carga parcial positiva, mientras que el oxígeno lleva una carga parcial negativa, creando así un dipolo

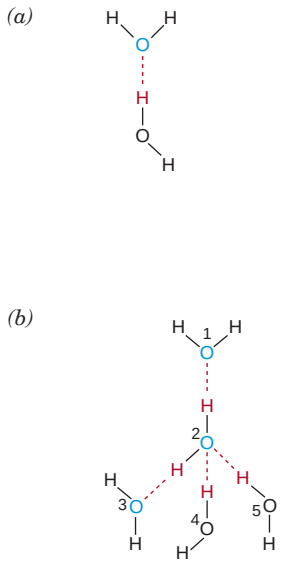


FIGURA 1.3
(*a*) Enlace de hidrógeno entre dos moléculas de agua, indicado por una línea discontinua. (*b*) Disposición tetraédrica de cinco moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno. Las moléculas de agua 1, 2 y 3 están en el plano de la página, la 4 está por debajo y la 5 por encima.

des físicas y químicas de este medio. La sección final de este capítulo bosqueja las actividades y papeles de los compartimientos subcelulares en los mamíferos.

1.2 | MEDIO CELULAR: AGUA Y SOLUTOS

Todas las células vivas contienen esencialmente los mismos iones inorgánicos, pequeñas moléculas orgánicas y tipos de macromoléculas. En la tabla 1.1 se resumen las clases generales de componentes celulares presentes en las células. Las concentraciones intracelulares de iones inorgánicos son similares en todas las células de mamíferos, pero muy diferentes de las del medio extracelular (ver p. 15). Los **microentornos**, creados en el interior de las células eucarióticas por los orgánulos, así como alrededor de las macromoléculas y las membranas, producen variaciones en la concentración de componentes en toda la célula. El **agua** es el componente común a todos los entornos. El agua es el disolvente en que están disueltas o suspendidas las sustancias necesarias para la existencia de la célula. La vida tal como la conocemos depende de las singulares propiedades físico-químicas del agua.

Entre moléculas de agua se forman puentes de hidrógeno

Dos átomos de hidrógeno comparten sus electrones con un par de electrones no compartidos de un átomo de oxígeno para formar la molécula de agua. El agua es una molécula polar porque el núcleo del oxígeno atrae los electrones compartidos con mayor fuerza que el hidrógeno, lo cual provoca una distribución desigual de los electrones compartidos por el oxígeno y los hidrógenos, creándose así una carga positiva parcial sobre cada hidrógeno y una carga negativa parcial sobre el oxígeno. El ángulo de enlace entre los hidrógenos y el oxígeno de 104,5° hace que la molécula sea eléctricamente asimétrica y que se forme un dipolo eléctrico (Figura 1.2).

Las moléculas de agua interaccionan entre sí porque la atracción de los átomos de hidrógeno de una molécula cargados positivamente por el átomo de oxígeno cargado negativamente de otra supone la formación de un enlace débil entre las dos moléculas de agua (Figura 1.3*a*). Este enlace, indicado por una línea discontinua, se denomina **puente de hidrógeno**. Sin embargo, estudios recientes indican que el enlace entre dos moléculas de agua es parcialmente covalente. En la página 135 se describen en detalle las interacciones no covalentes, entre ellas las electrostáticas, de van der Waals e hidrofóbicas. Cinco moléculas de agua pueden formar una estructura tetraédrica (Figura 1.3*b*) en la que cada oxígeno comparte sus electrones con cuatro hidrógenos y cada hidrógeno con otro oxígeno. En el hielo se forma una red de estructura tetraédrica, que le da su estructura cristalina. Algunos de estos enlaces se rompen a medida que el hielo se transforma en agua líquida. Los puentes de hidrógeno son relativamente débiles en comparación con los enlaces covalentes, pero la estabilidad del agua líquida se explica por el gran número de ellos que existe entre sus moléculas. El agua líquida tiene una estructura variable debido a que los enlaces de hidrógeno se rompen y se vuelven a formar rápidamente. La vida media de los enlaces de hidrógeno del agua es inferior a 1×10^{-10}s. Incluso a 100°C, el agua

TABLA 1.1 Componentes químicos de las células biológicas.

Componente	*Intervalo de masas moleculares*
H_2O	18
Iones inorgánicos: Na^+, K^+, Cl^-, SO_4^{2-}, HCO_3^- Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.	23–100
Moléculas orgánicas pequeñas Glúcidos, aminoácidos, lípidos, nucleótidos, péptidos	100–1200
Macromoléculas Proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos	50 000–1 000 000 000

líquida contiene un número significativo de puentes de hidrógeno, lo que explica su alto calor de vaporización. Los puentes de hidrógeno se rompen cuando el agua pasa del estado líquido al de vapor. Se han propuesto muchos modelos para la estructura del agua líquida, pero ninguno explica adecuadamente sus propiedades.

La estructura del agua pura se altera cuando las moléculas de agua forman puentes de hidrógeno con otras estructuras químicas. El medio acuoso de las células no es uniforme. Por ejemplo, las moléculas de agua están más ordenadas sobre la superficie de una membrana debido a la naturaleza anfipática de los lípidos de membrana. Ello crea un microentorno que puede alterar las actividades de algunas de las sustancias presentes en el medio. Cuando el agua está unida a proteínas y a ácidos nucleicos, estabilizando estas macromoléculas, también puede haber cambios similares en su estructura.

Los puentes de hidrógeno también se forman entre otras moléculas, y dentro de una misma molécula, siempre que un átomo electronegativo de oxígeno o de nitrógeno se encuentre cerca de un hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo. En la Figura 1.4 se muestran puentes de hidrógeno representativos. Los puentes de hidrógeno intramoleculares son muy abundantes en grandes macromoléculas, como las proteínas y los ácidos nucleicos, y son responsables en parte de su estabilidad estructural.

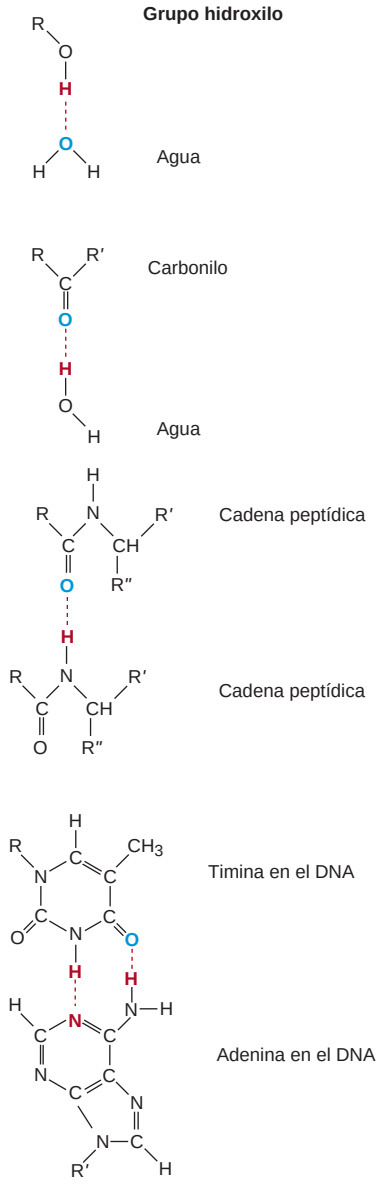


FIGURA 1.4
Puentes de hidrógeno representativos de importancia en sistemas biológicos.

El agua tiene propiedades únicas como disolvente

La naturaleza polar y la capacidad de formar puentes de hidrógeno son la base de las **propiedades únicas del agua como disolvente**. Las moléculas polares se dispersan fácilmente en el agua. Las **sales**, en las cuales la red cristalina se mantiene por la atracción entre los grupos positivos y negativos, son solubles en agua debido a que las fuerzas electrostáticas del cristal son superadas por la atracción de las cargas hacia el dipolo del agua. En el caso del NaCl, la atracción electrostática de los iones individuales de Na^+ y Cl^- es superada por la interacción del Na^+ con la carga negativa del oxígeno y del Cl^- con la carga positiva de los átomos de hidrógeno. Por tanto, una capa de agua rodea a los iones individuales. El número de interacciones débiles carga–carga entre el agua y los iones Na^+ y Cl^- es suficiente para mantener separados a los dos iones.

Muchas moléculas orgánicas que contienen grupos no iónicos pero débilmente polares también son solubles en agua a causa de la atracción de estos grupos por las moléculas de agua. Los azúcares y los alcoholes son fácilmente solubles en el agua por este motivo. Las **moléculas anfipáticas**, compuestos que contienen a la vez grupos polares y no polares, se dispersan en el agua si la atracción del grupo polar por el agua puede superar las interacciones hidrofóbicas de las partes no polares de la molécula. Las moléculas muy hidrofóbicas, tales como los compuestos que contienen cadenas hidrocarbonadas largas, no se dispersan fácilmente en forma de moléculas sencillas en el agua, sino que interaccionan entre sí para excluir las moléculas polares de agua.

Algunas moléculas se disocian en cationes y aniones

Las sustancias que en agua se disocian en un **catión** (ión cargado positivamente) y un **anión** (ión cargado negativamente) se denominan **electrolitos**, porque estos iones cargados facilitan la conducción de la corriente eléctrica a través del agua. Los azúcares y los alcoholes que se disuelven rápidamente en agua, pero no llevan ninguna carga ni se disocian en especies con carga, se clasifican como **no electrolitos**.

Las sales de los metales alcalinos (p. ej., Li, Na y K) se disocian totalmente cuando se disuelven en agua a bajas concentraciones, aunque no necesariamente a altas concentraciones. Sin embargo, es habitual considerar que tales compuestos y las sales de los ácidos orgánicos, por ejemplo, el lactato sódico, se encuentren completamente disociados en los sistemas biológicos, pues sus concentraciones son bajas. El anión disociado de un ácido orgánico, por ejemplo, el ión lactato, reacciona en cierta medida con un protón del agua para formar ácido no disociado (Figura 1.5). En una disolución de varias sales diferentes (p. ej., NaCl, K_2SO_4 y lactato de sodio), estas moléculas no existen como tales, sino como iones disociados (p. ej., Na^+, K^+, SO_4^{2-} y lactato$^-$). Sin embargo, muchos ácidos no se disocian totalmente cuando se di-

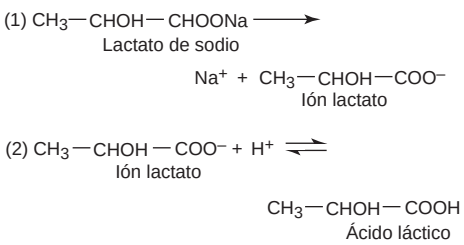


FIGURA 1.5
Reacciones que tienen lugar cuando el lactato sódico se disuelve en agua.

suelven en agua, sino que establecen un equilibrio entre las formas disociada y no disociada. Por ejemplo, el ácido láctico, un importante intermediario metabólico, se disocia parcialmente en un anión lactato y un protón (H^+), de la forma siguiente:

$$CH_3—CHOH—COOH \rightleftharpoons CH_3—CHOH—COO^- + H^+$$

Entre los componentes de la reacción se establece un equilibrio dinámico en el cual los productos de la reacción regeneran el reactivo no disociado, mientras que otras moléculas se disocian. El grado de disociación de un electrolito depende de la afinidad del anión por el H^+. Habrá una mayor disociación si las fuerzas dipolares débiles del agua que interacciona con el anión y el catión son más fuertes que las fuerzas electrostáticas entre el anión y el H^+. Estos compuestos tienen una menor capacidad para transportar carga eléctrica, a igual molaridad, que los que se disocian totalmente; se les denomina **electrolitos débiles**.

Los electrolitos débiles se disocian parcialmente

En la disociación parcial de un electrolito débil, representado por HA, la concentración de las diferentes especies puede determinarse a partir de la ecuación de equilibrio

$$K'_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \qquad \textbf{(1.1)}$$

K'_{eq} es una constante física, A^- representa el anión disociado y los corchetes indican la concentración de cada componente en moles por litro (mol L^{-1} o M) o milimoles por litro (mmol L^{-1} o mM). En la ecuación de equilibrio deberían utilizarse las **actividades** de cada especie en lugar de la concentración, pero puesto que la mayor parte de los compuestos de interés en los sistemas biológicos están presentes a bajas concentraciones, el valor de la actividad se aproxima al de la concentración. Sin embargo, la constante de equilibrio se representa como $\boldsymbol{K'_{eq}}$ para indicar que se trata de una constante de equilibrio aparente basada en las concentraciones. La disociación de un ácido aumenta con la temperatura. De la ecuación de disociación anterior resulta claro que si el grado de disociación de una sustancia es pequeño, K'_{eq} será un número pequeño (denominador grande en la ecuación 1.1), pero si el grado de disociación es grande, el número también será grande (denominador pequeño). Obviamente, K'_{eq} no se puede determinar en los compuestos que se disocian totalmente, pues en el equilibrio no queda soluto sin disociar.

El agua es un electrolito débil

El agua se disocia de la siguiente manera:

$$HOH \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

El protón disociado interacciona con el oxígeno de otra molécula de agua para formar un **ión hidronio**, H_3O^+. Una práctica generalmente aceptada, que seguiremos en este libro, consiste en representar el protón como H^+ en lugar de H_3O^+, aunque sea ésta la especie química que se halla presente. A 25°C el valor de la K'_{eq} para la disociación del agua es muy pequeño, del orden de $1{,}8 \times 10^{-16}$:

$$K'_{eq} = 1{,}8 \times 10^{-16} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \qquad \textbf{(1.2)}$$

Con un valor de K'_{eq} tan extremadamente pequeño, el número de moléculas disociadas es insignificante en relación con el número de moléculas no disociadas. Por lo tanto, la concentración del agua, que es 55,5 M, no se modifica esencialmente por la disociación. La ecuación 1.2 se puede rescribir como sigue:

$$K'_{eq} \times [H_2O] = [H^+][OH^-] \qquad \textbf{(1.3)}$$

$K'_{eq} \times [55{,}5]$ es constante y se denomina **producto iónico del agua**. Su valor a 25 °C es 1×10^{-14}. En agua pura, la concentración de H^+ es igual a la de OH^-,

y sustituyendo $[OH^-]$ por $[H^+]$ en la ecuación anterior, resulta que $[H^+]$ es 1×10^{-7} M. Igualmente, $[OH^-]$ también es 1×10^{-7} M. El equilibrio entre H_2O, H^+ y OH^- existe siempre en disolución con independencia de la presencia de sustancias disueltas; si alguna de ellas altera la concentración de H^+ o de OH^-, como ocurre al añadir un ácido o una base, se produce un cambio concomitante en el otro ión a fin de mantener la relación de equilibrio del agua. Utilizando la ecuación del producto iónico, se puede calcular $[H^+]$ o $[OH^-]$ si se conoce la concentración de uno de ellos. La importancia del ión hidrógeno en los sistemas biológicos se pondrá de manifiesto en el estudio de la actividad enzimática (ver p. 451) y del metabolismo.

Por conveniencia, $[H^+]$ se expresa normalmente en términos de **pH**, calculado de la siguiente manera:

$$\mathbf{pH} = \log \frac{1}{[H^+]} \qquad (1.4)$$

En agua pura, $[H^+]$ y $[OH^-]$ son ambas de 1×10^{-7} M, y el pH = 7,0. La concentración del ión OH^- se puede expresar como pOH. En el caso de la ecuación que describe la disociación del agua, $1 \times 10^{-14} = [H^+][OH^-]$ se transforma, utilizando logaritmos, en 14 = pH + pOH. En la tabla 1.2 se presenta la relación entre pH y concentración de H^+.

En la tabla 1.3 se presenta el pH de diferentes fluidos biológicos. En el plasma sanguíneo, $[H^+]$ es 0,00000004 M o un pH de 7,4. Otros cationes se encuentran entre 0,001 y 0,1 M, más de 10 000 veces la $[H^+]$. Un incremento de $[H^+]$ a 0,0000001 M (pH 7,0) o un descenso hasta 0,00000002 M (pH 7,8) en la sangre tiene consecuencias médicas graves, y es una amenaza para la vida.

TABLA 1.2 Relación entre $[H^+]$ y pH y entre $[OH^-]$ y pOH.

$[H^+]$ (*M*)	*pH*	$[OH^-]$ (*M*)	*pOH*
1,0	0	1×10^{-14}	14
0,1 (1×10^{-1})	1	1×10^{-13}	13
1×10^{-2}	2	1×10^{-12}	12
1×10^{-3}	3	1×10^{-11}	11
1×10^{-4}	4	1×10^{-10}	10
1×10^{-5}	5	1×10^{-9}	9
1×10^{-6}	6	1×10^{-8}	8
1×10^{-7}	7	1×10^{-7}	7
1×10^{-8}	8	1×10^{-6}	6
1×10^{-9}	9	1×10^{-5}	5
1×10^{-10}	10	1×10^{-4}	4
1×10^{-11}	11	1×10^{-3}	3
1×10^{-12}	12	1×10^{-2}	2
1×10^{-13}	13	0,1 (1×10^{-1})	1
1×10^{-14}	14	1,0	0

Muchas moléculas biológicamente importantes son ácidos o bases

Las definiciones de ácido y base propuestas por Lowry y Brønsted son las más útiles cuando se consideran sistemas biológicos. Un **ácido** es un **dador de protones** y una **base** es un **aceptor de protones**. El ácido clorhídrico (HCl) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) son **ácidos fuertes** porque se disocian totalmente, liberando H^+. El ión OH^- es una base. La adición un ácido o de una base al agua repercute en un nuevo equilibrio de $OH^- + H^+ \rightleftharpoons H_2O$. Cuando se combinan un ácido fuerte y el OH^-, el H^+ del ácido y el OH^- interaccionan casi por completo y se neutralizan recíprocamente casi totalmente.

Los aniones formados cuando los ácidos fuertes se disocian totalmente, como el Cl^- a partir del HCl, no son bases porque no se asocian con protones en disolución. La mayoría de los ácidos orgánicos (HA) sólo se disocian parcialmente en disolución acuosa, y se establece un equilibrio entre HA (el dador de protones), un anión del ácido (A^-) y un protón, de la siguiente manera:

$$HA \rightleftharpoons A^- + H^+$$

Los ácidos orgánicos normalmente son **ácidos débiles** porque están sólo parcialmente disociados. El anión formado en esta disociación es una base porque puede aceptar un protón y volver a formar el ácido. Un ácido débil y su base (anión), que se forma al disociarse, se conoce como **par conjugado**; en la tabla 1.4 se presentan diversos ejemplos de importancia biológica.

El ión amonio (NH_4^+) es un ácido porque se puede disociar dando H^+ y amoníaco no cargado (NH_3), que es la base conjugada. El ácido fosfórico (H_3PO_4) es un ácido y el PO_4^{3-} es una base, pero el $H_2PO_4^-$ y el HPO_4^{2-} son tanto bases como ácidos, dependiendo de si el grupo fosfato acepta o cede un protón.

La tendencia de un **ácido conjugado** a liberar H^+ puede estimarse a partir de la K'_{eq} (Ec. 1.2). Cuanto menor sea el valor de K'_{eq}, menor será la tendencia a ceder un protón y más débil será el ácido; cuanto mayor sea el valor de K'_{eq}, mayor será la tendencia a disociar un protón y más fuerte será el ácido. El agua es un ácido muy débil con una K'_{eq} de $1{,}8 \times 10^{-16}$ a 25°C.

Una forma conveniente de representar la K'_{eq} es en forma de **p*K′***, que se define como

$$\mathbf{p}K' = \log \frac{1}{K'_{eq}} \qquad (1.5)$$

TABLA 1.3 pH de algunos fluidos biológicos.

Fluido	*pH*
Plasma sanguíneo	7,4
Fluido intersticial	7,4
Fluido intracelular	
Citosol (hígado)	6,9
Matriz lisosómica	menos de 5,0
Jugo gástrico	1,5–3,0
Jugo pancreático	7,8–8,0
Leche humana	7,4
Saliva	6,4–7,0
Orina	5,0–8,0

TABLA 1.4 Algunos pares ácido-base conjugados de importancia en sistemas biológicos.

Dador de protones (ácido)		*Aceptor de protones (base)*
$CH_3—CHOH—COOH$ (ácido láctico)	$\rightleftharpoons$	$H^+ + CH_3—CHOH—COO^-$ (lactato)
$CH_3—CO—COOH$ (ácido pirúvico)	$\rightleftharpoons$	$H^+ + CH_3—CO—COO^-$ (piruvato)
$HOOC—CH_2—CH_2—COOH$ (ácido succínico)	$\rightleftharpoons$	$2H^+ + {}^-OOC—CH_2—CH_2—COO^-$ (succinato)
$^+H_3NCH_2—COOH$ (glicina)	$\rightleftharpoons$	$H^+ + {}^+H_3N—CH_2—COO^-$ (glicinato)
H_3PO_4	$\rightleftharpoons$	$H^+ + H_2PO_4^-$
$H_2PO_4^-$	$\rightleftharpoons$	$H^+ + HPO_4^{2-}$
HPO_4^{2-}	$\rightleftharpoons$	$H^+ + PO_4^{3-}$
Glucosa 6-PO_3H^-	$\rightleftharpoons$	H^+ + glucosa 6-PO_3^{2-}
H_2CO_3	$\rightleftharpoons$	$H^+ + HCO_3^-$
NH_4^+	$\rightleftharpoons$	$H^+ + NH_3$
H_2O	$\rightleftharpoons$	$H^+ + OH^-$

Obsérvese la similitud entre esta definición y la del pH; al igual que entre el pH y la $[H^+]$, la relación entre pK' y K'_{eq} es inversa; por lo tanto, cuanto menor sea la K'_{eq} mayor será el pK'. En la tabla 1.5 se muestran valores representativos de K'_{eq} y pK' de ácidos conjugados de importancia biológica.

Un caso especial de ácido débil de importancia médica es el ácido carbónico (H_2CO_3). Cuando el **dióxido de carbono** se disuelve en agua da lugar a las siguientes reacciones de equilibrio:

$$CO_2 + H_2O \overset{K'_2}{\rightleftharpoons} H_2CO_3 \overset{K'_1}{\rightleftharpoons} H^+ + HCO_3^-$$

TABLA 1.5 Constantes de disociación aparentes pK' de algunos compuestos de importancia en Bioquímica.

Compuesto	*Estructuras*	K'_{eq} (M)	pK'
Ácido acético	$CH_3—COOH$	$1{,}74 \times 10^{-5}$	4,76
Alanina	$CH_3—CH(NH_3^+)—COOH$	$4{,}57 \times 10^{-3}$	2,34 (COOH)
		$2{,}04 \times 10^{-10}$	9,69 (NH_3^+)
Ácido cítrico	$HOOC—CH_2—C(COOH)OH—CH_2—COOH$	$8{,}12 \times 10^{-4}$	3,09
		$1{,}77 \times 10^{-5}$	3,74
		$3{,}89 \times 10^{-6}$	5,41
Ácido glutámico	$HOOC—CH_2—CH_2—CH(NH_3^+)—COOH$	$6{,}45 \times 10^{-3}$	2,19 (COOH)
		$5{,}62 \times 10^{-5}$	4,25 (COOH)
		$2{,}14 \times 10^{-10}$	9,67 (NH_3^+)
Glicina	$CH_2(NH_3^+)—COOH$	$4{,}57 \times 10^{-3}$	2,34 (COOH)
		$2{,}51 \times 10^{-10}$	9,60 (NH_3^+)
Ácido láctico	$CH_3—CHOH—COOH$	$1{,}38 \times 10^{-4}$	3,86
Ácido pirúvico	$CH_3—CO—COOH$	$3{,}16 \times 10^{-3}$	2,50
Ácido succínico	$HOOC—CH_2—CH_2—COOH$	$6{,}46 \times 10^{-5}$	4,19
		$3{,}31 \times 10^{-6}$	5,48
Glucosa 6-PO_3H^-	$C_{12}H_{11}O_5\ PO_3H^-$	$7{,}76 \times 10^{-7}$	6,11
	H_3PO_4	1×10^{-2}	2,0
	$H_2PO_4^-$	$2{,}0 \times 10^{-7}$	6,7
	HPO_4^{2-}	$3{,}4 \times 10^{-13}$	12,5
	H_2CO_3	$1{,}70 \times 10^{-4}$	3,77
	NH_4^+	$5{,}62 \times 10^{-10}$	9,25
	H_2O	$1{,}8 \times 10^{-16}$	15,74

El **ácido carbónico** (H_2CO_3) tiene un pK_1' de 3,77, que es comparable con el de los ácidos orgánicos como por ejemplo el ácido láctico. La ecuación de equilibrio para esta reacción es

$$K_1' = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} \quad \textbf{(1.6)}$$

El ácido carbónico está, sin embargo, en equilibrio con el CO_2 disuelto, y la ecuación de equilibrio para esta reacción es

$$K_2' = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2][H_2O]} \quad \textbf{(1.7)}$$

Despejando $[H_2CO_3]$ de la Ec. 1.7 y substituyéndola en la Ec. 1.6, las dos reacciones de equilibrio pueden combinarse en una sola ecuación:

$$K_1' = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{K_2'[CO_2][H_2O]} \quad \textbf{(1.8)}$$

La reordenación para combinar las constantes e incluir la concentración del H_2O simplifica la ecuación y se obtiene una nueva constante combinada, K_3':

$$K_1'K_2'[H_2O] = K_3' = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]} \quad \textbf{(1.9)}$$

Es habitual en medicina expresar el CO_2 disuelto en términos del ácido conjugado; éste es el anhídrido ácido del H_2CO_3. El término K_3' tiene un valor de $7{,}95 \times 10^{-7}$ y el pK_3' de 6,1. Si el sistema acuoso está en contacto con el aire, el CO_2 disuelto también estará en equilibrio con el CO_2 del aire. Un aumento o disminución de cualquiera de los componentes (es decir, CO_2 (aire), CO_2 (disuelto), H_2CO_3, H^+ o HCO_3^-), producirá un cambio en todos los demás componentes. El sistema CO_2– HCO_3^- es extremadamente importante en la homeostasis del pH en los animales.

La ecuación de Henderson–Hasselbalch define la relación entre el pH y las concentraciones de un ácido y una base conjugados

Un cambio en la concentración de cualquier componente en una reacción de equilibrio necesita de un cambio concomitante de cada componente. Un incremento de $[H^+]$ disminuirá la concentración de **base conjugada** (p. ej., ión lactato) con un incremento equivalente del **ácido conjugado** (p. ej., ácido láctico). Esta relación se pone de manifiesto reordenando la ecuación de equilibrio y despejando H^+, tal como se muestra para la siguiente disociación:

$$\text{ácido conjugado} \rightleftharpoons \text{base conjugada} + H^+$$

$$K_{eq}' = \frac{[H^+][\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]} \quad \textbf{(1.10)}$$

Reordenando la ecuación 1.10 y dividiendo por $[H^+]$ y K_{eq}' se obtiene:

$$\frac{1}{[H^+]} = \frac{1}{[K_{eq}']} \cdot \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]} \quad \textbf{(1.11)}$$

Tomando logaritmos en ambos miembros,

$$\log \frac{1}{[H^+]} = \log \frac{1}{K_{eq}'} + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]} \quad \textbf{(1.12)}$$

Puesto que $pH = \log (1/[H^+])$ y $pK' = \log (1/K_{eq}')$, la ecuación (1.12) se transforma en:

$$\mathbf{pH = pK' + \log \frac{[base\,conjugada]}{[ácido\,conjugado]}} \quad \textbf{(1.13)}$$

La ecuación 1.13, desarrollada por Henderson y Hasselbalch, es una forma conveniente de poner de manifiesto la relación entre el pH de una disolución y las can-

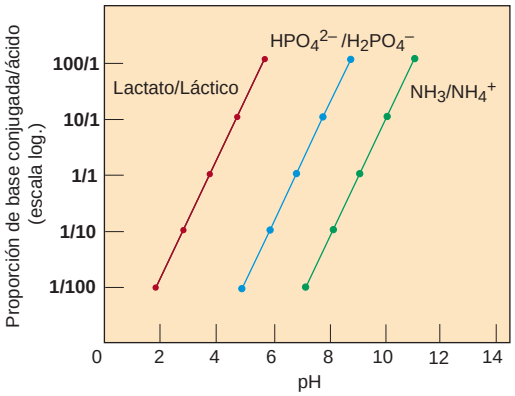


FIGURA 1.6
Proporción de [base]/[ácido] conjugados en función del pH.
Cuando la proporción [base]/[ácido] es 1, el pH es igual al pK' del ácido débil.

tidades relativas de base conjugada y de ácido conjugado presentes. El análisis de la Ec. 1.13 demuestra que cuando la proporción [base]/[ácido] es 1:1, el pH es igual al pK' del ácido, porque log 1 = 0 y pH = pK'. Si el pH es una unidad menor que el pK', la relación [base]/[ácido] es 1:10, y si el pH está una unidad por encima del pK', la relación [base]/[ácido] es 10:1. La Figura 1.6 es una representación de las relaciones de base conjugada y ácido conjugado frente al pH para varios ácidos débiles; las relaciones se expresan en escala logarítmica.

La capacidad de amortiguación es importante para controlar el pH

Cuando se añade NaOH a una disolución de un ácido débil, la relación [base conjugada]/[ácido conjugado] cambia. El NaOH se disocia totalmente y los iones OH^- formados son neutralizados por los H^+ presentes para formar H_2O. La disminución de $[H^+]$ provoca una disociación adicional del ácido débil para satisfacer los requerimientos de su reacción de equilibrio. La cantidad de ácido débil disociado será, pues, prácticamente igual (habitualmente se considera igual) a la cantidad de OH^- añadida. En consecuencia, la disminución de ácido conjugado es igual a la cantidad de base conjugada formada. Estas etapas están representadas en las curvas de titulación de dos ácidos débiles de la Figura 1.7. Cuando se añaden 0,5 equivalentes de OH^-, el 50% del ácido débil está disociado, y la relación [ácido]/[base] es 1,0; en este punto el pH es igual al pK' del ácido. Las formas de las curvas de titulación son similares, pero se encuentran desplazadas debido a la diferencia de pK'. Cuando sólo se añaden 0,1 equivalentes de OH^- se produce un incremento brusco de pH, pero cuando se añaden entre 0,1 y 0,9 equivalentes de OH^-, el cambio de pH es de sólo ~2. Por tanto, una gran cantidad de OH^- repercute en un cambio de pH relativamente pequeño. Este efecto se denomina **amortiguación** y se define como la capacidad de una disolución para oponerse al cambio de pH cuando se añade un ácido o una base. Si no estuviese presente un ácido débil, una pequeña cantidad de OH^- produciría un gran aumento del pH, ya que no habría una fuente de H^+ para neutralizar los OH^-.

El mejor intervalo de amortiguación para un par conjugado se encuentra en el intervalo de pH alrededor del pK' del ácido débil. Empezando desde un pH inferior al pK' en una unidad hasta un pH superior en una unidad, se disociará alrededor del 82% de un ácido débil en disolución, y, por tanto, se puede neutralizar una cantidad de base equivalente a un 82% del ácido original con un cambio del pH de 2. Se considera que la máxima capacidad amortiguadora de un par conjugado se encuentra entre una unidad de pH por debajo y una unidad por encima del pK'. El par conjugado ión lactato/ácido láctico con un pK' = 3,86 es un amortiguador efectivo entre pH 3 y pH 5, pero tiene poca capacidad amortiguadora a pH 7,0. El par $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$, con pK' = 6,7, es un amortiguador efectivo a pH = 7,0. Por tanto, en el pH del citosol celular (~7,0) el par ión lactato/ácido láctico no es un amortiguador efectivo, pero sí lo es el $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$.

La **capacidad amortiguadora** también depende de la concentraciones del ácido y de la base conjugados. Cuanto mayor sea la concentración de base conjugada, ma-

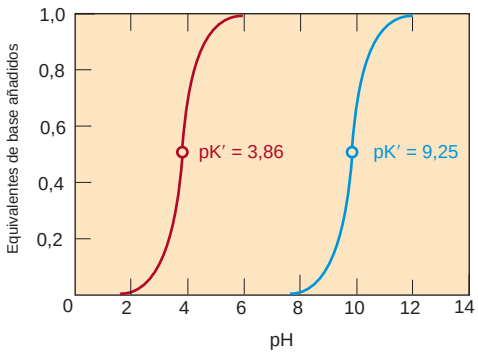


FIGURA 1.7
Curvas de titulación ácido–base del ácido láctico (pK' 3,86) y del NH_4^+ (pK' 9.25).
En el valor de pH igual al pK' habrá una cantidad igual de ácido y de base para cada par conjugado.

yor será la cantidad de H^+ con los que aquélla pueda reaccionar, y cuanto más ácido conjugado haya, más OH^- podrá ser neutralizado por la disociación del ácido. Un caso típico es el del plasma sanguíneo, que tiene un pH de 7,4. El valor 6,7 del pK' de $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ sugiere que este par conjugado es un amortiguador efectivo; sin embargo, la concentración del par fosfato es baja comparada con la del sistema HCO_3^-/CO_2, que con un pK' de 6,1 está presente a una concentración 20 veces superior y es responsable de la mayor parte de la capacidad amortiguadora. Al considerar la capacidad amortiguadora se han de tener en cuenta tanto el pK' como la concentración del par conjugado. La mayoría de los ácidos orgánicos tienen relativamente poca importancia como amortiguadores en los fluidos celulares debido a que sus pK' se encuentran varias unidades por debajo del pH de la célula, y sus concentraciones son demasiado bajas en comparación con las de sistemas amortiguadores como el $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ y el HCO_3^-/CO_2.

La Figura 1.8 presenta algunos problemas típicos en los que se utiliza la ecuación de Henderson–Hasselbalch. No se puede insistir demasiado en la importancia del control del pH y la amortiguación en seres humanos; la Apli. Clín. 1.1 es un caso representativo de la práctica clínica.

1. Calcular la relación HPO_4^{2-} / $H_2PO_4^-$ (pK=6,7) a pH 5,7, 6,7 y 8,7.

   Solución: $$\mathbf{pH = pK + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}}$$

   $$5,7 = 6,7 + \log \text{ de la relación; reordenando}$$

   $$5,7 - 6,7 = -1 = \log \text{ de la relación}$$

   El antilog de –1 = 0,1 o 1/10. Por tanto, $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ = 1/10 at pH 5,7. Utilizando el mismo procedimiento, la relación a pH 6,7 = 1/1 y a pH 8,7 = 100/1.

2. Si el pH de la sangre es 7,1 y la concentración de HCO_3^- es 8 mM, ¿cuál es la concentración de CO_2 (pK' para HCO_3^-/CO_2 = 6,1)?

   Solución: $$\mathbf{pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}}$$

   $$7,1 = 6,1 + \log (8 \text{ mM} / [CO_2]); \text{ reordenado}$$

   $$7,1 - 6,1 = 1 = \log (8 \text{ mM} / [CO_2]).$$

   El antilog de 1 = 10. Por tanto, 10 = 8 mM / $[CO_2]$, o $[CO_2]$ = 8 mM/10 = 0,8 mM.

3. Al pH sanguíneo normal de 7,4, la suma de $[HCO_3^-]$ + $[CO_2]$ = 25,2 mM. ¿Cuáles son las concentraciones de HCO_3^- y CO_2 (pK' para HCO_3^-/CO_2 = 6,1)?

   Solución: $$\mathbf{pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}}$$

   $$7,4 = 6,1 + \log ([HCO_3^-] / [CO_2]); \text{ reordenado}$$

   $$7,4 - 6,1 = 1,3 = \log ([HCO_3^-] / [CO_2]).$$

   El antilog de 1,3 es 20. Por tanto, $[HCO_3^-] / [CO_2] = 20$. Como $[HCO_3^-] + [CO_2] = 25,2$, resolveremos este sistema de dos ecuaciones reordenando la primera ecuación:

   $$[HCO_3^-] = 20\,[CO_2]$$

   y aplicándola en la segunda,

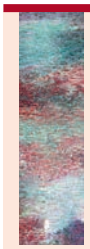
   $$20\,[CO_2] + [CO_2] = 25,2$$

   o

   $$CO_2 = 1,2 \text{ mM}$$

   Ahora, utilizando este valor, 1,2 + $[HCO_3^-]$ = 25,2, y despejando, $[HCO_3^-]$ = 24 mM.

FIGURA 1.8
Problemas típicos de pH y amortiguadores.



APLICACIÓN CLÍNICA 1.1
Concentración de bicarbonato en sangre en la acidosis metabólica

En los adultos normales, los amortiguadores de la sangre mantienen el pH sanguíneo en un valor de alrededor de 7,40; la condición correspondiente a un descenso del pH por debajo de 7,35 se denomina acidosis. Un pH sanguíneo cercano a 7,0 puede provocar serias complicaciones e incluso la muerte. Por tanto, en caso de acidosis, y particularmente si está causada por un cambio metabólico, es importante controlar los parámetros ácido–base de la sangre del paciente. Los datos de interés clínico comprenden el pH y las concentraciones de HCO_3^- y CO_2. Los valores normales son pH = 7,40; $[HCO_3^-]$ = 24,0 mM y $[CO_2]$ = 1,20 mM. Si los valores sanguíneos de un paciente con acidosis metabólica fuesen pH = 7,03 y $[CO_2]$ = 1,10 mM, ¿cuál será la $[HCO_3^-]$ en la sangre del paciente y qué parte de la $[HCO_3^-]$ normal se habrá usado para amortiguar el exceso de ácido causante de la anomalía?

1. La ecuación de Henderson–Hasselbalch es:

   $$pH = pK' + \log([HCO_3^-]/[CO_2])$$

   El pK' para $[HCO_3^-]/[CO_2]$ es 6,10.
2. Sustituyendo los valores dados en la ecuación.

   $$7,03 = 6,10 + \log([HCO_3^-]/1,10 \text{ mM})$$

   o bien

   $$7,03 - 6,10 = 0,93 = \log([HCO_3^-]/1,10 \text{ mM})$$

   El antilogaritmo de 0,93 es 8,5; por tanto

   $$8,5 = [HCO_3^-]/1,10 \text{ mM}$$

   o bien

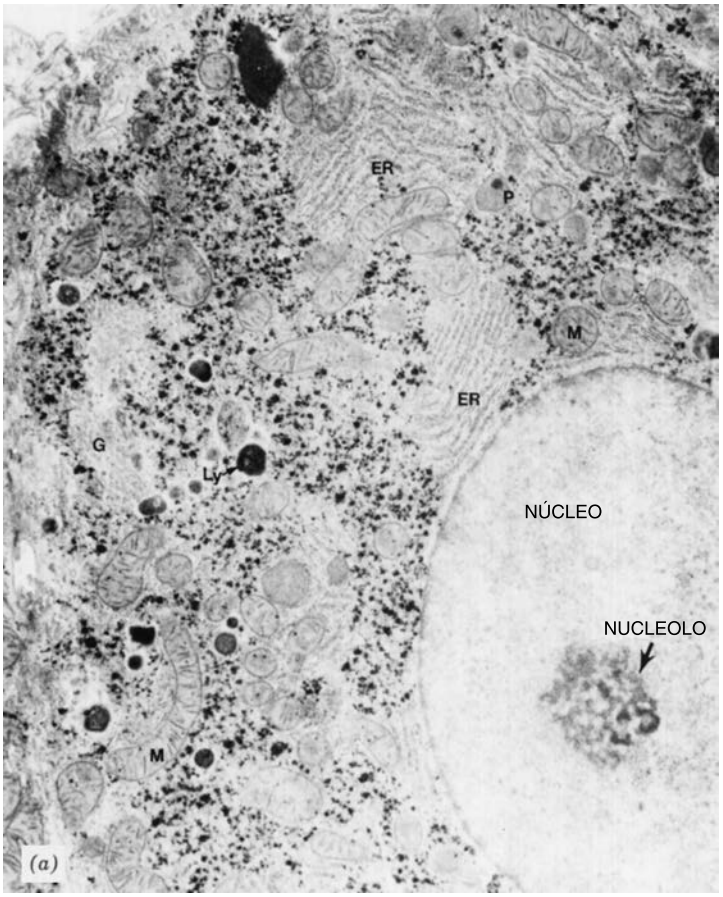
   $$[HCO_3^-] = 9,4 \text{ mM}$$

3. Puesto que el valor de $[HCO_3^-]$ normal es 24 mM, se ha producido una disminución de 14,6 mmol de HCO_3^- por litro de sangre en este paciente. Si se perdiera mucho más HCO_3^- se llegaría a un punto en el que este importante amortiguador sería incapaz de amortiguar más ácido en la sangre y el pH disminuiría rápidamente.

1.3 ORGANIZACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Las células eucarióticas contienen orgánulos celulares bien definidos tales como el núcleo, las mitocondrias, los lisosomas y los peroxisomas, todos ellos limitados por una membrana (Figura 1.9). Las membranas también forman redes de tipo tubular que abarcan toda la célula, tales como el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi, que forman un sistema de espacios interconectados o cisternas, respectivamente. Las funciones específicas y las actividades de estos orgánulos se describen en la Sección 1.4.

La naturaleza lipídica de las **membranas celulares** impide el movimiento rápido de muchas moléculas, agua incluida, a través de ellas. La presencia de meca-



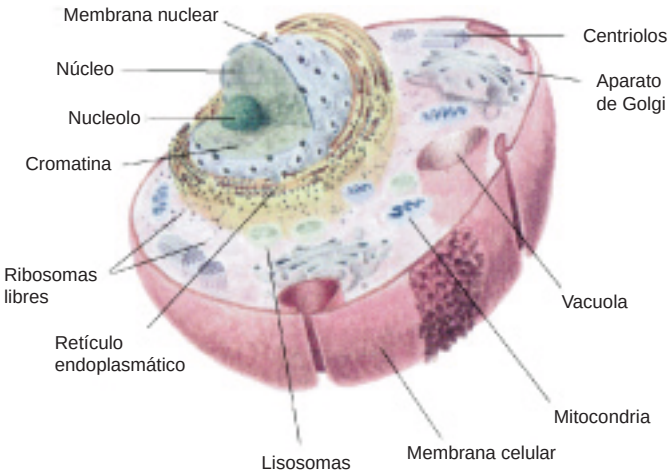


FIGURA 1.9
(*a*) Micrografía electrónica de una célula de hígado de rata marcada para indicar los componentes estructurales principales de las células eucarióticas. (*b*) Dibujo esquemático de una célula animal. Obsérvese el número y variedad de orgánulos subcelulares y la red de membranas de interconexión que rodean los conductos, es decir, cisternas. No todas las células eucarióticas tienen una apariencia tan compleja, si bien la mayoría de ellas contienen las estructuras principales mostradas en la figura. ER, retículo endoplasmático; G, zona de Golgi; Ly, lisosomas; P, peroxisomas; M, mitocondria. *Fotografía (a) reproducida con permiso del Dr. K. R. Porter de la obra* Fine Structure of Cells and Tissues *de Porter, K. R. y Bonneville, M. A. Philadelphia: Lea & Febiger, 1972. Esquema (b) reproducido de Voet, D. y Voet, J. G. de la obra* Biochemistry, *2nd ed. New York: Wiley, 1995. Reproducido con permiso de John Wiley & Sons, Inc.*

nismos de transporte específicos para la translocación de moléculas grandes o pequeñas, cargadas o no, permite que la membranas regulen la concentración de sustancias en los diversos compartimientos celulares. Así, el citosol y la matriz fluida de los orgánulos tienen una composición en iones inorgánicos, moléculas orgánicas, proteínas y ácidos nucleicos definida. El reparto de actividades y componentes en compartimientos rodeados de membrana y en orgánulos tiene una serie de ventajas para la economía celular, entre las que se incluyen la captación de sustratos y cofactores allí donde son requeridos y el ajuste del pH y la composición iónica para la máxima actividad de los procesos biológicos.

Las actividades y composición de las estructuras y orgánulos celulares se han determinado en células intactas mediante técnicas de tinción histoquímica, inmunológica y fluorescente. Ahora es posible la observación continua en tiempo real de los acontecimientos celulares en células viables intactas; por ejemplo, los estudios de los cambios de pH y de la concentración de iones calcio en el citosol mediante indicadores específicos. Los orgánulos individuales, las membranas y los componentes del citoplasma pueden ser aislados y analizados después de la rotura de la membrana plasmática. Entre las técnicas para romper membranas se encuentran el uso de detergentes, el choque osmótico y la homogenización de tejidos, donde las fuerzas de cizalla rompen la membrana plasmática. Los sistemas de membrana y los orgánulos celulares pueden separarse mediante centrifugación en un medio de aislamiento adecuado gracias a las diferencias de tamaño y densidad. Estas técnicas permiten el aislamiento de fracciones celulares a partir de la mayoría de los tejidos de mamíferos. Además, los componentes de los orgánulos celulares, tales como el núcleo y las mitocondrias, también pueden aislarse después de la rotura de la membrana del orgánulo.

En muchos casos, las estructuras aisladas y las fracciones celulares retienen las características químicas y bioquímicas de las estructuras *in situ*. Pero los sistemas de membrana biológicos son estructuras muy sensibles, expuestos a sufrir daños incluso en condiciones muy suaves. Las alteraciones que ocurren durante el aislamiento provocan cambios de composición. La lesión de la membrana puede alterar sus propiedades de permeabilidad de manera que permita el paso de sustancias que normalmente serían excluidas. Además, muchas proteínas están asociadas débilmente a las membranas y se disocian fácilmente (véase p. 502).

Como es de suponer, existen diferencias en la estructura, composición y actividades de las células pertenecientes a diferentes tejidos, debido a sus diferentes funciones. Sin embargo, las principales actividades bioquímicas son similares en todos los tejidos. Las diferencias entre los tipos celulares normalmente tienen que ver con las actividades específicas que las distinguen.

Composición química de las células

Los compartimientos celulares contienen un fluido acuoso o **matriz** que contiene diversos iones, moléculas orgánicas de baja masa molecular y una amplia variedad de proteínas, y, en algunos casos, ácidos nucleicos. Se ha determinado la localización en la célula de la mayoría de los enzimas y ácidos nucleicos, pero la composición iónica exacta de la matriz de los orgánulos celulares todavía se desconoce. Probablemente cada uno de ellos posea una composición iónica y un pH diferentes. En la Figura 1.10 se muestra la composición iónica del fluido intracelular, considerada como representativa del citosol principalmente, comparada con la del plasma sanguíneo. El principal catión extracelular es el $\mathbf{Na^+}$, con una concentración de ~140 meq L^{-1} (mM); en cambio, hay poco Na^+ en el fluido intracelular. El $\mathbf{K^+}$ es el principal catión intracelular. El $\mathbf{Mg^{2+}}$ está presente tanto en los compartimientos intra como extracelulares a concentraciones mucho más bajas que el K^+ y el Na^+. Los principales aniones extracelulares son $\mathbf{Cl^-}$ y $\mathbf{HCO_3^-}$, con cantidades menores de fosfato y sulfato. Muchas proteínas tienen carga negativa a pH 7,4 (ver Capítulo 3), y se comportan como aniones al pH de los fluidos tisulares. El fosfato inorgánico, los compuestos de fosfato orgánico y las proteínas son los principales aniones intracelulares. Otros aniones y cationes orgánicos e inorgánicos están presentes en concentraciones bastante por debajo del orden de los meq L^{-1}. La *concentración total de aniones iguala la concentración total de cationes en los diferentes fluidos*, a excepción de las muy pequeñas diferencias creadas por las membranas en las que aparece un potencial de membrana.

Las concentraciones intracelulares de la mayoría de las moléculas orgánicas de baja masa molecular, tales como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos e interme-

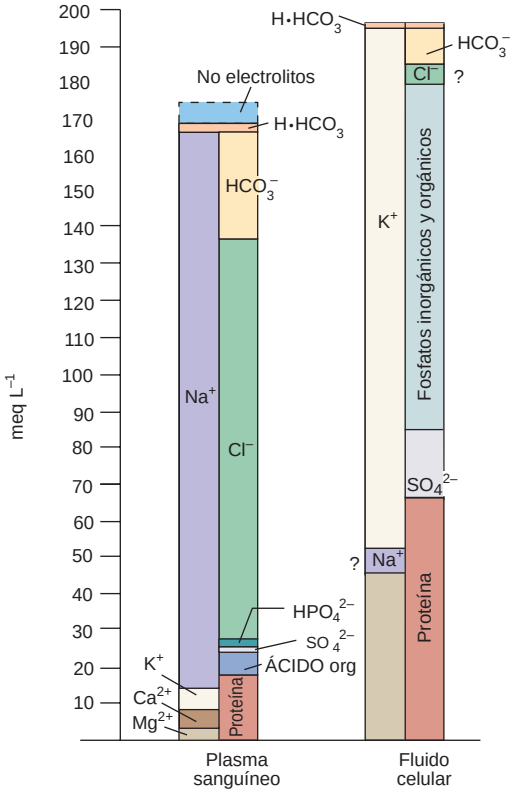


FIGURA 1.10
Principales constituyentes químicos del plasma sanguíneo y del fluido celular. La altura de la mitad izquierda de cada columna indica la concentración total de cationes; la de la derecha, la concentración de aniones. Ambas se expresan en meq/litro de fluido (meq L^{-1}). Obsérvese que los valores de cloruro y de sodio del fluido celular son dudosos. Es probable que, al menos en el músculo, el citosol contenga sodio pero no cloruro. *Adaptado de M. I., Gregersen. En P. Bard (Ed)* Medical Physiology, *11th ed., Mosby, St. Louis, MO, 1961, p. 307.*

diarios fosforilados, se encuentran en el intervalo 0,01–1,0 meq L^{-1}, pero pueden ser significativamente más bajas. Los coenzimas, moléculas orgánicas requeridas para la actividad de algunos enzimas, tienen concentraciones del mismo orden. Los sustratos de los enzimas se hallan presentes en concentraciones relativamente bajas, comparadas con las de los iones inorgánicos, pero en el interior de un orgánulo específico o en un microentorno celular las concentraciones pueden aumentar considerablemente.

Tiene poco interés determinar la concentración molar de las proteínas individuales de las células. En muchos casos están localizadas en estructuras específicas, o en combinación con otras proteínas para crear unidades funcionales. Las proteínas desempeñan su función, sea estructural, catalítica o reguladora, en compartimientos definidos.

1.4 | PAPEL FUNCIONAL DE LOS ORGÁNULOS SUBCELULARES Y DE LAS MEMBRANAS

La localización subcelular de los procesos y rutas metabólicos se describirá en capítulos posteriores. Algunas rutas se encuentran localizadas en su totalidad en un solo compartimiento celular, pero muchas otras están repartidas entre dos localizaciones y los intermediarios de la ruta deben difundir o ser transportados de un compartimiento celular al otro. Los orgánulos tienen funciones muy específicas por lo que sus actividades enzimáticas específicas pueden aprovecharse para identificarlos durante su aislamiento. A continuación se describen brevemente algunos de los papeles principales de las estructuras de las células eucarióticas con objeto de poner de manifiesto el grado de complejidad y organización de las células. En la tabla 1.6

TABLA 1.6 Resumen de los principales compartimientos de la célula eucariótica y de sus funciones.

Compartimiento	*Funciones principales*
Membrana plasmática	Transporte de iones y moléculas
	Reconocimiento
	Receptores de moléculas pequeñas y grandes
	Morfología y movimiento celular
Núcleo	Síntesis y reparación de DNA
	Síntesis de RNA
Nucleolo	Maduración de RNA y síntesis de los ribosomas
Retículo endoplasmático	Síntesis de membranas
	Síntesis de proteínas y lípidos para orgánulos celulares y exportación
	Síntesis de lípidos y esteroides
	Reacciones de destoxificación
Aparato de Golgi	Modificación y clasificación de proteínas para incorporarlas a membranas y orgánulos o exportarlas
	Exportación de proteínas
Mitocondrias	Producción de ATP
	Respiración celular
	Oxidación de glúcidos y lípidos
	Síntesis de urea y del hemo
Lisosomas	Digestión celular: hidrólisis de proteínas, glúcidos, lípidos y ácidos nucleicos
Peroxisomas	Oxidación de lípidos
	Reacciones de oxidación que implican O_2 molecular
	Utilización de H_2O_2
Microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos	Citoesqueleto celular
	Morfología celular
	Movilidad celular
	Movimientos intracelulares
Citosol	Metabolismo de glúcidos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos
	Síntesis de proteínas

se resumen las funciones y la división del trabajo en las células eucarióticas; las estructuras se muestran en la Figura 1.9.

La membrana plasmática delimita la célula

La superficie exterior de la **membrana plasmática** está en contacto con un medio exterior variable y la superficie interior con un medio relativamente estable creado por el citoplasma celular. Como se verá en el Capítulo 12, la composición y las funciones de los dos lados de la membrana plasmática son distintas. La superficie exterior establece interacciones adhesivas con la matriz extracelular y con otras células mediante las **integrinas**, proteínas de transmembrana. Las integrinas se unen al citoesqueleto en el interior de la célula. Estas proteínas también participan en la transducción de señales a través de la membrana. Junto con los elementos del citoesqueleto, la membrana plasmática participa en el mantenimiento de la forma de la célula y en sus movimientos. La naturaleza lipídica de las membranas excluye muchas sustancias, incluidas las proteínas y otras macromoléculas, pero la presencia de poros y mecanismos de transporte específicos permite la captación selectiva de iones y moléculas orgánicas. Las células se comunican entre sí a través de la membrana plasmática; la membrana contiene muchos receptores proteicos específicos para la unión de señales extracelulares, como las hormonas (véase el Capítulo 21) y los neurotransmisores, liberadas por otras células. La membrana plasmática eucariótica tiene diferentes proteínas en distintos **dominios de membrana**, y su composición proteica varía según el tipo celular. Los detalles de la estructura y la bioquímica de las membranas se presentan en el Capítulo 12.

La síntesis del DNA y RNA tiene lugar en el núcleo

Los primeros microscopistas distinguieron en el interior de las células eucariótas un **núcleo**, un gran compartimiento rodeado de membrana, y el **citoplasma**. El núcleo está rodeado por dos membranas denominadas **envoltura**, o **cubierta nuclear**; la membrana externa está comunicada con las membranas del retículo endoplasmático. La cubierta nuclear tiene numerosos poros de unos 90 Å de diámetro que permiten el movimiento controlado de partículas y moléculas entre la matriz nuclear y el citoplasma. Algunas macromoléculas como el RNA son transportadas activamente a través de los poros de la envoltura nuclear. El núcleo contiene un subcompartimiento principal, claramente visible en las micrografías electrónicas, denominado **nucleolo**. El **ácido desoxirribonucleico** (**DNA**), depositario de la información genética, está localizado en el núcleo en forma de un complejo DNA–proteína, la **cromatina**, que está organizada en cromosomas. En el núcleo tienen lugar los procesos bioquímicos implicados en la replicación del DNA antes de la mitosis y en la reparación del DNA dañado (ver Capítulo 4). La transcripción de la información genética almacenada en el DNA en una forma que pueda ser traducida a proteínas celulares (ver Capítulo 5) implica la síntesis y modificación de varias formas de ácido ribonucleico (RNA) en el núcleo. La maduración del RNA ribosómico y la formación de las subunidades ribosómicas tiene lugar en el nucleolo.

El retículo endoplasmático participa en la síntesis proteica y en otras muchas rutas de síntesis

El citoplasma de la mayoría de las células eucarióticas contiene una malla de membranas interconectadas que se extiende desde la envoltura nuclear hasta la membrana plasmática. Esta extensa estructura, denominada **retículo endoplasmático** (**ER**), consta de membranas con un aspecto rugoso (**ER rugoso** o RER) en algunas zonas y liso (**ER liso** o CER) en otras. El ER define un compartimiento celular, la luz del ER, donde las proteínas recién sintetizadas destinadas a la exportación o a la incorporación en orgánulos son modificadas. La apariencia rugosa se debe a la presencia de **partículas de ribonucleoproteína**, los **ribosomas**, unidas al lado citosólico. Durante el fraccionamiento celular el retículo endoplasmático se rompe y los fragmentos de membrana forman pequeñas vesículas, denominadas **microsomas**, que se pueden aislar mediante centrifugación diferencial. Los microsomas, como tales, no se hallan presentes en las células.

La función principal de los ribosomas del **retículo endoplasmático rugoso** es la biosíntesis de las proteínas que se incorporarán a los orgánulos celulares o que serán exportadas al exterior de la célula. El **retículo endoplasmático liso** interviene en la síntesis de lípidos y contiene una clase importante de enzimas llamados **citocromos P450** que catalizan la hidroxilación de una gran variedad de compuestos exógenos y endógenos. Estos enzimas son importantes en la biosíntesis de las hormonas esteroides y en la eliminación de sustancias tóxicas (véase capítulo 11). El retículo endoplasmático y el aparato de Golgi están implicados en la formación de otros orgánulos celulares, como los lisosomas y los peroxisomas.

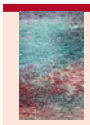
El aparato de Golgi participa en la secreción de proteínas

El **aparato de Golgi** es una malla de sacos membranosos lisos y aplanados —**cisternas**— y vesículas, responsables de la secreción al exterior de la célula de proteínas tales como hormonas, proteínas del plasma sanguíneo y enzimas digestivos. Actúa en concierto con el retículo endoplasmático, donde se sintetizan proteínas destinadas a incorporarse a determinados lugares. Enzimas presentes en las membranas del aparato de Golgi catalizan la transferencia de glúcidos a las proteínas para formar glucoproteínas, proceso importante en la determinación del destino final de las proteínas. El aparato de Golgi es el lugar principal de síntesis de nueva membrana y es responsable de la formación de los lisosomas y los peroxisomas. Las vesículas de membrana transportan proteínas entre la cisternas; las vesículas que se liberan de una cisterna se funden con otra con ayuda de una familia de proteínas denominada **SNARE**. Las vesículas que se forman en el aparto de Golgi transportan proteínas a la membrana plasmática para su secreción.

Las mitocondrias proporcionan la mayor parte del ATP necesario para la célula

En el microscopio electrónico, las **mitocondrias** aparecen como esferas, varillas o cuerpos filamentosos, que normalmente tienen entre 0,5–1 μm de diámetro y hasta 7 μm de longitud. La matriz interna, el **mitosol**, está rodeada por dos membranas claramente diferentes, tanto en apariencia como en función bioquímica. La membrana interna se repliega dentro de la matriz formando **crestas** y contiene un gran número de pequeñas esferas unidas a la superficie interna mediante pedúnculos. La estructura de las crestas puede ser tubular o lamelar, según el tejido y el estado conformacional de las mitocondrias. Las membranas interna y externa son muy diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas. Los componentes del sistema de transporte electrónico y del mecanismo de síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa forman parte de la membrana interna y se describen en detalle en el Capítulo 13. En el mitosol se localizan las rutas metabólicas implicadas en la oxidación de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos y algunas reacciones de la síntesis de la urea y el hemo. La membrana externa contiene poros que permiten el acceso de grandes moléculas, pero la membrana interna es altamente selectiva y contiene numerosos sistemas de transporte de transmembrana. Las mitocondrias tienen un importante papel en el envejecimiento, y el citocromo *c*, un componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, es un iniciador de la apoptosis o muerte celular programada (véase p. 23).

Las mitocondrias participan en su propia replicación. Contienen varias copias de un DNA circular (**mtDNA**), con información genética para 13 proteínas mitocondriales y algunos RNA. El tamaño del DNA (16 569 pares de bases) es similar al de los cromosomas bacterianos. La presencia de un "genoma" independiente y su parecido con las bacterias ha llevado a la hipótesis ampliamente aceptada de que estos orgánulos fueron bacterias que establecieron una relación simbiótica con las células eucarióticas hace unos tres mil millones de años. Las mitocondrias se heredan por vía materna, por lo que el análisis del mtDNA de diferentes individuos ha permitido estudiar los desplazamientos de las poblaciones humanas. Las mitocondrias también poseen RNA únicos (véase p. 85) y enzimas necesarios para la síntesis proteica. Sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales proceden de genes presentes en el DNA nuclear y que son sintetizadas en los ribosomas libres del citosol y luego importadas por el orgánulo. Se han descrito más de 150 enfermedades genéticas relacionadas con las actividades de las mitocondrias; algunas se deben a mutaciones del DNA nuclear que codifica proteínas mitocondriales y otras a mutaciones del DNA mitocondrial (véase la Apli. Clín. 1.2).



APLICACIÓN CLÍNICA 1.2
Enfermedades mitocondriales

En 1962 se describió por primera vez una enfermedad (enfermedad de Luft) asociada a la transducción de energía en las mitocondrias. El paciente de 30 años presentaba un debilitamiento general, transpiración excesiva, alta ingesta calórica sin incremento del peso corporal y un metabolismo basal (una medida de la utilización del oxígeno) excesivamente elevado. Se demostró que el paciente tenía un defecto en el mecanismo que controla la utilización del oxígeno por las mitocondrias (véase el Capítulo 13). Desde entonces se han identificado más de 150 enfermedades genéticas asociadas a las mitocondrias, consistentes en alteraciones en enzimas, ácidos ribonucleicos, elementos del transporte electrónico y sistemas de transporte de membrana. Tanto las mutaciones en el mtDNA como en el DNA nuclear dan lugar a enfermedades genéticas mitocondriales. La primera enfermedad causada por una mutación en el mtDNA que se identificó fue la neuropatía óptica hereditaria de Leber, que provoca ceguera repentina al principio de la edad adulta. Muchas de estas enfermedades afectan al músculo esquelético y al sistema nervioso central. El DNA mitocondrial puede resultar dañado por los radicales libres (superóxidos) formados en la mitocondria. Así, enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento, tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y las cardiomiopatías pueden estar relacionadas con lesiones mitocondriales. En las Apli. Clín. 6.5 (p. 254), 13.2 (p. 557), 13.4 (p. 558), 13.5 (p. 589) y 13.6 (p. 589) se describen los detalles de enfermedades específicas.

Luft, R. The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8731,1944; Chalmers, R. M. and Schapira, A. H. V. Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1410: 147, 1999; Wallace, D. C. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Am.* 280:40, 1997; and Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482, 1999.

TABLA 1.7 Enzimas lisosómicos representativos y sus sustratos.

Tipo de sustrato y enzima	*Sustrato específico*
ENZIMAS HIDROLIZANTES DE POLISÁCARIDOS	
α-Glucosidasa	Glucógeno
α-Flucosidasa	Fucosa de la membrana
β-Galactosidasa	Galactósidos
α-Manosidasa	Manósidos
β-Glucuronidasa	Glucurónidos
Hialuronidasa	Ácido hialurónico y condroitín sulfatos
Arilsulfatasa	Sulfatos orgánicos
Lisozima	Paredes celulares bacterianas
ENZIMAS HIDROLIZANTES DE PROTEÍNAS	
Catepsinas	Proteínas
Colagenasa	Colágeno
Elastasa	Elastina
Peptidasas	Péptidos
ENZIMAS HIDROLIZANTES DE ÁCIDOS NUCLEICOS	
Ribonucleasa	RNA
Deoxirribonucleasa	DNA
ENZIMAS HIDROLIZANTES DE LÍPIDOS	
Lipasas	Ésteres de triacilglicéridos y colesterol
Esterasa	Ésteres de ácidos grasos
Fosfolipasa	Fosfolípidos
FOSFATASAS	
Fosfatasa	Fosfomonoésteres
Fosfodiesterasa	Fosfodiésteres
SULFATASAS	
	Sulfato de heparano
	Sulfato de dermatano

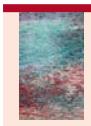
Los lisosomas son necesarios para la digestión intracelular

Los **lisosomas** se encargan de la **digestión intracelular** de sustancias extracelulares e intracelulares. Los lisosomas tienen una sola membrana limitante y mantienen la matriz a un pH ácido de ~5. Encapsulados en los lisosomas, se encuentran una clase de enzimas glicoproteicos, denominados hidrolasas, que catalizan la rotura hidrolítica de los enlaces carbono–oxígeno, carbono–nitrógeno, carbono–azufre y oxígeno–fósforo en las proteínas, los lípidos, los glúcidos y los ácidos nucleicos. En la tabla 1.7 se presenta una lista parcial de enzimas lisosómicos. Al igual que en la digestión gastrointestinal, las hidrolasas lisosómicas rompen las moléculas complejas en compuestos simples de menor masa molecular que pueden ser reutilizados en las rutas metabólicas de la célula. Los enzimas lisosómicos son más activos a pH ácido. La relación entre el pH y la actividad enzimática se estudia en la página 451.

El contenido enzimático de los lisosomas varía en los diferentes tejidos y depende de las necesidades propias de cada uno de ellos. La membrana lisosómica es impermeable tanto a moléculas pequeñas como a grandes, y se necesitan proteínas mediadoras específicas, receptores y transportadores para la translocación de sustancias a través de la membrana. *In vitro*, los lisosomas no catalizan la hidrólisis de sustancias añadidas hasta que se rompe su membrana; su actividad enzimática se califica de "**latente**". La rotura de la membrana en el interior de la célula puede provocar la digestión celular. Patologías tales como la artritis, algunas respuestas alérgicas, diversas enfermedades musculares y la destrucción tisular inducida por fármacos se han atribuido a la liberación de enzimas lisosómicos (véase la Apli. Clín. 1.3).

Los lisosomas están implicados en la digestión de sustancias intra y extracelulares que deben ser eliminadas. Mediante **endocitosis**, el material externo es introducido en la célula y encapsulado en vesículas rodeadas de membrana (Figura 1.11). Este proceso tiene lugar mediante diferentes mecanismos; uno de ellos utiliza varias proteínas citosólicas, entre ellas la clatrina (véase p. 941), para formar vesículas revestidas que se separan de la membrana por gemación. La membrana plasmática se invagina alrededor de partículas extrañas, tales como microorganismos, en la **fagocitosis**, mientras que el fluido extracelular que contiene material en suspensión es captado por **pinocitosis**. Las vesículas que contienen material externo se fusionan con lisosomas para formar **lisosomas secundarios** o **vacuolas digestivas**, que contienen el material que ha de ser digerido y las hidrolasas lisosómicas necesarias para llevar a cabo la digestión. Estas vacuolas se identifican al microscopio por su tamaño y, a menudo, por la presencia de estructuras parcialmente digeridas. Los lisosomas cuyos enzimas aún no están implicados en el proceso digestivo se denominan **lisosomas primarios**.

Las proteínas celulares, los ácidos nucleicos y los lípidos, así como estructuras tales como las mitocondrias, se encuentran en un estado dinámico de síntesis y degradación. Los lisosomas son responsables de la hidrólisis de estos componentes celulares, que se conoce por **autofagia**. Las sustancias destinadas a ser degradadas son identificadas y captadas por los lisosomas o son primero encapsuladas en vesículas membranosas que se fusionan con un lisosoma. En la Figura 1.11 se muestra un esquema del proceso.



APLICACIÓN CLÍNICA 1.3
Enzimas lisosómicos y gota

El catabolismo de las purinas, compuestos heterocíclicos nitrogenados que se hallan en los ácidos nucleicos, conduce a la formación de ácido úrico, que normalmente se excreta por la orina (para los detalles, véase la p. 840). En la gota el ácido úrico se produce en exceso, lo que provoca una elevación de su concentración en la sangre y la deposición de cristales de urato en las articulaciones. Las manifestaciones clínicas comprenden inflamación, dolor, hinchazón y la elevación de la temperatura en algunas articulaciones, en particular en el dedo pulgar del pie. El ácido úrico es poco soluble, y algunos síntomas clínicos de la gota pueden atribuirse a daños provocados por los cristales de urato. Los cristales son fagocitados por las células en las articulaciones y se acumulan en las vacuolas digestivas que contienen enzimas lisosómicos. Estos cristales causan la rotura de las vacuolas, con la consiguiente liberación de enzimas lisosómicos en el citosol. Aunque el pH óptimo de los enzimas lisosómicos es inferior al pH del citosol, éstos presentan una cierta actividad hidrolítica a pH más elevado, que causa la digestión de componentes celulares, la liberación de sustancias de la célula y la autolisis celular.

Weissmann, G. Crystals, lysosomes and gout. *Adv. Intern. Med.* 19:239, 1974; y Burt, H. M., Kalkman, P. H., y Mauldin, D. Membranolytic effects of crystalline monosodium urate monohydrate. *J. Rheumatol.* 10:440,1983.

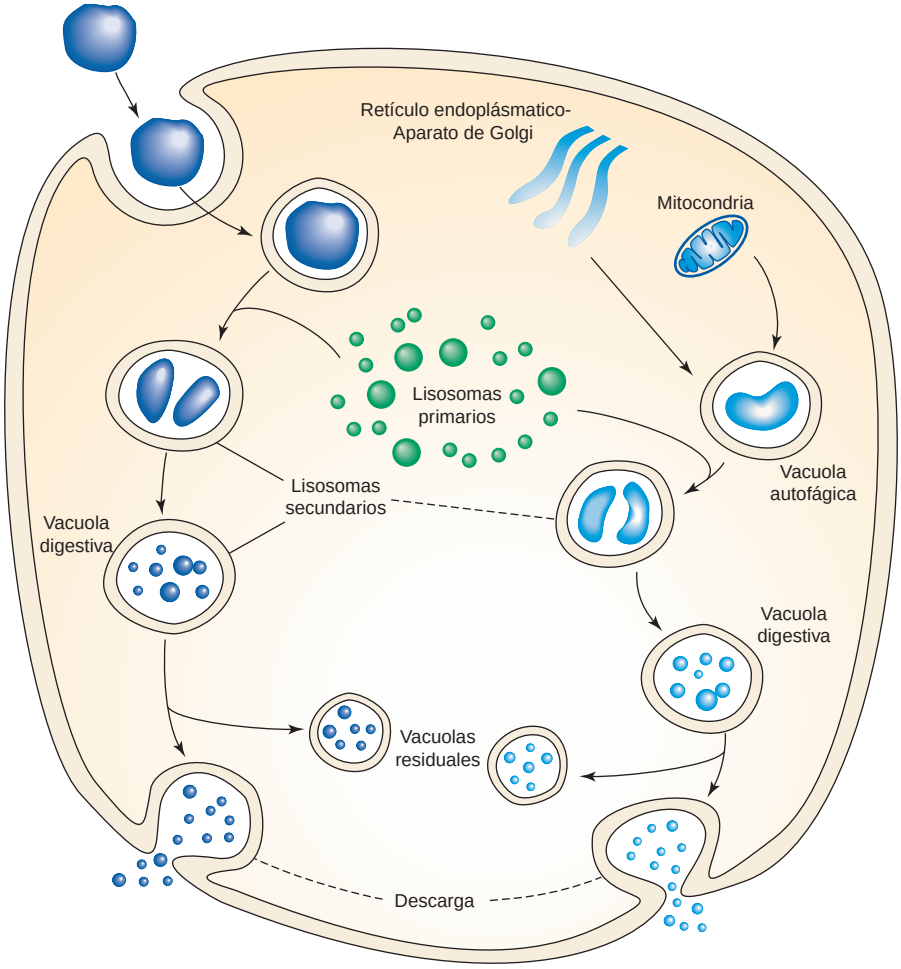
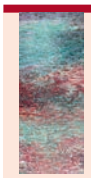


FIGURA 1.11
Representación esquemática del papel de los lisosomas en la digestión intracelular de sustancias internalizadas por fagocitosis (heterofagia) y de componentes celulares (autofagia).
En ambos procesos las sustancias que van a ser digeridas son englobadas en una vesícula membranosa, la cual se fusiona posteriormente con un lisosoma primario para formar un lisosoma secundario.

Los productos de la digestión lisosómica son liberados de los lisosomas y son reutilizados por la célula. El material no digerible se acumula en vesículas denominadas cuerpos residuales, cuyo contenido se elimina de la célula mediante **exocitosis**. Algunos cuerpos residuales contienen elevadas concentraciones de una sustancia pigmentada químicamente heterogénea que contiene ácidos grasos poliinsaturados y proteínas, denominada **lipofuscina**, o "**pigmento senil**" o "**pigmento de desgaste**", que se acumula en las células. La lipofuscina se ha observado especialmente en neuronas postmitóticas y en células musculares y se ha relacionado con el envejecimiento.

Algunos enzimas lisosómicos son secretados por la célula de forma controlada para digerir material extracelular en el tejido conjuntivo y en la glándula prostática. En varias enfermedades genéticas falta alguno de los enzimas lisosómicos, con la consiguiente acumulación del correspondiente sustrato. Los lisosomas de las células afectadas aumentan de tamaño a causa del material sin digerir, lo cual interfiere con los procesos celulares normales. Estas enfermedades se denominan "**enfermedades de almacenamiento lisosómico**" (véase p. 762); para la descripción de una carencia de lipasa lisosómica véase la Apli. Clín. 1.4. Otro trastorno relacionado con los lisosomas, la **enfermedad celular I**, lo provoca la falta de los mecanismos ne-



APLICACIÓN CLÍNICA 1.4
Carencia de lipasa ácida lisosómica

La lipasa ácida lisosómica humana (hLAL) hidroliza los triacilgliceroles en ácidos grasos libres y glicerol y los ésteres de colesterol en colesterol libre y ácidos grasos. Es un enzima fundamental en el metabolismo del colesterol que permite obtener colesterol libre para las necesidades celulares. La enfermedad del almacenamiento de ésteres de colesterol y la enfermedad de Wolman son dos formas fenotípicamente distintas de la deficiencia genética de hLAL. Ambas son enfermedades autosómicas recesivas poco frecuentes. La enfermedad del almacenamiento de ésteres de colesterol se diagnostica normalmente en adultos y se manifiesta por hipercolesterolemia, hepatomegalia y aparición precoz de ateroesclerosis. Los individuos afectados expresan actividad hLAL, pero de muy bajo nivel (<5% de la normal). Aparentemente este nivel es suficiente para hidrolizar los triacilgliceroles, pero no los ésteres de colesterol. El análisis del gen del enzima muestra la presencia de una mutación en ambos alelos en un sitio de corte y empalme (véase p. 225), que da lugar a un enzima inestable y catalíticamente defectuoso.

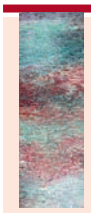
La enfermedad de Wolman se presenta en recién nacidos y suele ser mortal hacia el año de edad. No se detecta actividad hLAL. Tanto los triacilgliceroles como los ésteres de colesterol se acumulan en los tejidos. El análisis genético ha mostrado la presencia de una mutación homocigótica que da lugar a un producto génico que no puede ser traducido a un enzima activo.

Hegele, R. A., Little, J. A., Vezina, C., et al. Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical and molecular genetic characteristics. *Atherosclerosis and Thrombosis* 13:720, 1993; Lohse, P., Maas, S., Lohse, P., Elleder, M., Kirk, J. M., Besley, G. T., and Seidel, D. Compound heterozygosity for a Wolman mutation is frequent among patients with cholesteryl ester storage disease. *J. Lipid Res.* 41:23, 2000; y Anderson, R. A., Bryson, G. M., and Parks, J. S. Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype in Wolman and cholesteryl ester storage disease. *Mol. Genet. Metab.* 68:333, 1999.

(1) $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

(2) $RH_2 + H_2O_2 \longrightarrow R + 2H_2O$

FIGURA 1.12
Reacciones catalizadas por la catalasa.



APLICACIÓN CLÍNICA 1.5

Anomalías de la biogénesis de peroxisomas

Los peroxisomas son responsables de una serie de importantes reacciones metabólicas, entre las que se encuentran la síntesis de éteres de glicerol, el acortamiento de los ácidos grasos de cadena muy larga, para que las mitocondrias puedan oxidarlos completamente, y la oxidación de la cadena lateral del colesterol, necesaria para la síntesis de ácidos biliares. Las anomalías de la biogénesis de peroxisomas (PBD) son más de 25 dolencias relacionadas genética y fenotípicamente que afectan las actividades enzimáticas de los peroxisomas. Se trata de enfermedades autosómicas recesivas poco frecuentes, caracterizadas por alteraciones en el hígado, riñones, cerebro y sistema esquelético. Se han descrito diversas alteraciones bioquímicas en las PBD, entre las que se encuentran la disminución de los niveles de éteres lipídicos del glicerol (plasmalógenos), aumento de los niveles de ácidos grasos de cadena muy larga (C_{24} y C_{26}) y aumento de los niveles de derivados del ácido colestanoico (precursores de los ácidos biliares). La dolencia más grave es el síndrome de Zellweger, debido a la ausencia de peroxisomas funcionales; la muerte se produce a menudo antes de los 6 meses de edad. En esta enfermedad el defecto genético se encuentra en el mecanismo para importar los enzimas en la matriz de los peroxisomas. Se han encontrado las mutaciones responsables de algunas PBD, entre las que se encuentran mutaciones que afectan a los mecanismos de corte y empalme y mutaciones sin sentido (véase p. 192); en algunos casos la enfermedad se debe a la ausencia de un único enzima o a defectos en los componentes del transporte de membrana. En algunos casos es posible el diagnóstico prenatal de la enfermedad mediante el análisis de los enzimas peroxisómicos o de los ácidos grasos de las células del fluido amniótico.

Wanders, R. J., Schutgens, R. B., and Barth, P. G. Peroxisomal disorders: a review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54:726,1995; Fitzpatrick, D. R. Zellweger syndrome and associated phenotypes. *J. Med. Genet.* 33:863, 1996; and Warren, D. S., Wolfe, B. D., and Gould, S. J. Phenotype–genotype relationships in PEX10-deficient peroxisome biogenesis disorder patients. *Hum. Mutat.* 15:509, 2000.

cesarios para hacer llegar los enzimas lisosómicos a los lisosomas; los enzimas hidrolíticos son exportados fuera de la célula, donde causan daños a la matriz extracelular (véase la Apli. Clín. 6.8, p. 263).

Los peroxisomas tienen un importante papel en el metabolismo lipídico

La mayor parte de las células eucarióticas de mamíferos, así como las de protozoos y plantas, tienen unos orgánulos denominados **microcuerpos** o **peroxisomas**, que contienen varios enzimas que producen o utilizan **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2). Estos orgánulos son pequeños (0,3–1,5 mm de diámetro), de forma ovalada o esférica, con una fina malla tubular en la matriz. Se han identificado más de 50 enzimas en los peroxisomas de diferentes tejidos. El número de peroxisomas en una célula depende de las condiciones celulares. Diferentes clases de **xenobióticos**, es decir, sustancias ajenas al organismo, incluida la aspirina, provocan la proliferación de los peroxisomas en el hígado. Los peroxisomas tienen un papel esencial en la degradación de los lípidos, en particular en la oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga (véase p. 722) y en la síntesis de glicerolípidos, éteres lipídicos del glicerol (plasmalógenos) e isoprenoides (véase el Capítulo 16). También contienen enzimas que oxidan los D-aminoácidos, el ácido úrico y varios 2-hidroxiácidos utilizando O_2 molecular con formación de H_2O_2. La **catalasa**, un enzima presente en los peroxisomas, cataliza la conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno y la oxidación de varios compuestos por H_2O_2 (Figura 1.12). Al contener los enzimas de producción y utilización de peróxido en un mismo compartimiento, las células se autoprotegen de la toxicidad del H_2O_2.

Se conocen más de 25 enfermedades de la biogénesis de los peroxisomas (véase la Apli. Clín. 1.5).

El citoesqueleto organiza el contenido intracelular

Las células eucarióticas poseen microtúbulos, filamentos intermediarios y filamentos de actina (microfilamentos) que forman parte del entramado del citoesqueleto. El **citoesqueleto** interviene en el mantenimiento de la morfología celular, el transporte intracelular, la motilidad celular y la división celular. Los **microtúbulos** son multímeros de **tubulina**, una proteína que se polimeriza o despolimeriza rápidamente según las necesidades de las células. La actina y la miosina forman los filamentos del músculo estriado y son responsables de la contracción muscular (véase el Capítulo 23). Tres **proteínas** mecanoquímicas, la **miosina**, la **dineína** y la **quinesina**, convierten la energía química en energía mecánica para el movimiento de los componentes celulares. Estos **motores moleculares** están asociados al citoesqueleto. La dineína interviene en el movimiento ciliar y flagelar, mientras que la quinesina es la fuerza motriz responsable del movimiento de vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos, en especial en los axones de las neuronas.

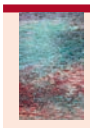
El citosol contiene los componentes celulares solubles

El plasma libre de orgánulos o **citosol** es menos complejo en estructura, aunque no en composición química. Es ahí donde tienen lugar muchas de las reacciones y rutas del metabolismo. Aunque no existe una estructura definida en el citosol, su elevado contenido proteico impide que éste sea una mezcla homogénea de componentes solubles, además, es probable que en el ámbito del citosol haya compartimientos funcionales. Muchas reacciones estan localizadas en áreas determinadas de la célula, en las cuales la disponibilidad de sustrato es más favorable. Las condiciones fisicoquímicas del citosol son poco conocidas. Una de las funciones principales del citosol es sostener mediante el suministro de intermediarios la síntesis de proteínas, tanto en los ribosomas libres, a menudo en forma de polisomas, como en los que están unidos al retículo endoplasmático.

Algunos enzimas se encuentran disueltos en el citosol aislado, pero en la célula intacta muchos de ellos podrían estar débilmente unidos a estructuras membranosas o a componentes del citoesqueleto.

1.5 INTEGRACIÓN Y CONTROL DE LAS FUNCIONES CELULARES

La célula eucariótica es una estructura compleja que mantiene un medio intracelular que permite que una multitud de funciones y reacciones complejas transcurran de la forma más eficiente posible. Las células de los organismos multicelulares también participan en el mantenimiento del buen funcionamiento de todo el organismo, ejerciendo las influencias recíprocas necesarias para mantener equilibradas todas las actividades celulares y tisulares. Para conseguir este equilibro los procesos intracelulares y las rutas metabólicas están controladas e integradas de forma muy estrecha. Muy pocas funciones operan de manera totalmente independiente; los cambios en una función pueden influir, positiva o negativamente, en otras funciones. Como se describirá a lo largo de todo el texto, las funciones son reguladas a muchos niveles, desde la expresión de un gen que cambia la concentración de un enzima o de un efector proteico a cambios en las concentraciones de sustratos o de coenzimas que alteran la velocidad de reacciones enzimáticas específicas. La integración de muchos procesos celulares está controlada por proteínas que actúan de activadores o de inhibidores. Para mantener la homeostasis celular se precisan controles tanto positivos como negativos. Muchos procesos celulares están programados para tener lugar en condiciones específicas; por ejemplo, la división celular en células normales no progresa sin control, sino solamente cuando los procesos requeridos para la división celular han sido activados. Sólo entonces se produce una serie integrada y ordenada de reacciones que culminan en la división de la célula en dos células hijas. Un proceso fascinante es la **apoptosis** o muerte celular programada, también conocida como suicidio celular. Este proceso estrechamente regulado ocurre en todas las células de mamífero, pero las etapas individuales del proceso varían según el tejido. La Apli. Clín. 1.6 presenta una revisión de la apoptosis y algunas situaciones clínicas en las cuales las anomalías de este proceso pueden ser causa de enfermedades. Como se destaca a lo largo de todo este libro, muchas enfermedades se deben al fallo de mecanismos de control específicos. Cuanto más progresamos en la compresión de la complejidad de las cé-



APLICACIÓN CLÍNICA 1.6
Apoptosis: Muerte celular programada

Las células eucarióticas tienen mecanismos regulados genéticamente para la muerte celular programada, conocida por apoptosis. La muerte celular programada es importante durante la embriogénesis y a lo largo de la vida adulta, y tiene lugar cuando una célula ha cumplido su función biológica. Es diferente de la muerte celular por necrosis causada por efecto de las radiaciones o la anoxia. El inicio de la apoptosis tiene tres fases: una señal de inicio, la activación de una cascada de reacciones que comprende factores proteicos y la activación de enzimas proteolíticos específicos.

Diferentes células tienen receptores altamente específicos en la membrana plasmática, conocidos como receptores de muerte, que unen proteínas específicas que hacen que la célula inicie la apoptosis. Varias proteínas, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) han sido identificadas como "señales de muerte". La especificidad de los receptores y de las señales de muerte determina qué células sufrirán apoptosis. Los receptores de muerte son proteínas transmembrana con dominios intracelulares, denominados dominios de muerte. Cuando el receptor es activado por unión de una señal extracelular, el dominio de muerte se une a proteínas específicas y promueve una cascada de interacciones proteína-proteína. Las proteasas, denominadas caspasa 8 y 9, son activadas, y a su vez activan otras caspasas. Los enzimas de la familia de las caspasas están presentes como proenzimas (inactivos) y son activados por corte en tres subunidades, dos de las cuales forman un heterodímero activo. Catalizan la hidrólisis de proteínas celulares específicas, cuyo resultado es la desorganización de la célula.

El estrés intracelular, como, por ejemplo, el causado por la fragmentación de la membrana mitocondrial, también provoca la apoptosis. Este mecanismo consiste en la liberación de citocromo *c* de las mitocondrias, que junto con otro factor proteico, Apaf-1, activa la caspasa 9 e inicia la cascada de muerte celular. La cascada está regulada por proteínas pro- y antiapoptóticas, tales como Bcl-2/Bax. Un cambio en el equilibrio de estos factores puede conducir tanto a la muerte celular prematura como a la división celular incontrolada.

Las anomalías de la ruta de apoptosis se han relacionado con diversas dolencias, tales como enfermedades autoinmunes, inflamatorias, malignas y neurodegenerativas, y con infecciones víricas tales como el VIH, que atacan al sistema inmunitario. La comprensión de las diferentes rutas de la apoptosis puede facilitar el desarrollo de terapias para estas enfermedades.

Randhawa, B. A. S., Apoptosis. *Mol. Pathol.* 53:55, 2000; Konopleva, M., Zhao, S., Xie, Z., Segall, H., et.al. Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 457:217, 1999; and Wei, M. C., Zong, W., Cheng, E. H., Lindsten, T., et.al. Proapoptoxic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727, 2001.

lulas, más sorprendente resulta que no haya más errores y más individuos aquejados de enfermedades. Así pues, cuando en los próximos capítulos analicemos por separado los componentes químicos y las actividades de las células, será importante tener presentes las actividades concurrentes y circundantes, sus limitaciones y la influencia del medio. Sólo juntando todas las partes y actividades celulares, es decir, volviendo a montar el rompecabezas, apreciaremos cuan extraordinaria es la célula viva.

BIBLIOGRAFÍA

Agua y electrolitos

Dick, D. A. T. *Cell Water.* Washington, DC: Butterworths, 1966.

Eisenberg, D. and Kauzmann, W. *The Structures and Properties of Water.* Fairlawn, NJ: Oxford University Press, 1969.

Morris, J. G. *A Biologist's Physical Chemistry.* Reading, MA: Addison-Wesley, 1968.

Westof, E. *Water and Biological Macromolecules.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.

Wiggins, P. M. Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* 54:432, 1990.

Estructura celular

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell,* 3rd ed. New York: Garland Publishing, 1994.

Becker, W. M. and Deamer, D. W. *The World of the Living Cell,* 2nd ed. Redwood City, CA: Benjamin, 1991.

DeDuve, C. *Guided Tour of the Living Cell,* Vols. 1 and 2. New York: Scientific American Books, 1984.

Dingle, J. T., Dean, R. T., and Sly, W. S. (Eds.). *Lysosomes in Biology and Pathology.* Amsterdam: Elsevier (una publicación periódica que trata todos los aspectos de los lisosomas).

Holtzman, E. and Novikoff, A. B. *Cells and Organelles,* 3rd ed. New York: Holt, Rinehart & Winston, 1984.

Hoppert, M. and Mayer, F. Principles of macromolecular organization and cell function in bacteria and archaea. *Cell Biochem. Biophys.* 31:247, 1999.

Porter, K. R. and Bonneville, M. A. *Fine Structure of Cells and Tissues.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1972.

Vale, R. D. Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 3:347, 1987.

Orgánulos celulares

Attardi, G. and Chomyn, A. *Mitochondrial Biogenesis and Genetics.* San Diego, CA: Academic Press, 1995.

Fujiki, Y. Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *Fed. Eur. Biochem. Lett.* 476: 42, 2000.

Holtzman, E. *Lysosomes.* New York: Plenum Press, 1989.

Kiberstis, P. A. Mitochondria make a comeback. *Science* 283:1475, 1999. Serie de artículos que desciben descubrimientos recientes sobre las mitocondrias.

Latruffe, N. and Bugaut, M. *Peroxisomes.* New York: Springer-Verlag, 1994.

Lestienne, P. (Ed.). *Mitochondrial Diseases: Models and Methods.* Heidelberg: Springer, 1999.

Moser, H. W. Molecular genetics of peroxisomal disorders. *Frontiers Biosci.* 5:D298, 2000.

Pavelka, M. *Functional Morphology of the Golgi Apparatus.* New York: Springer-Verlag, 1987.

Preston. T. M., King, C. A., and Hyams, J. S. *The Cytoskeleton and Cell Motility.* New York: Chapman and Hall, 1990.

Rothman, J. E. and Orci, L. Budding vesicles in living cells. *Sci. Am.* 274:70, 1996.

Scheffler, I. E. *Mitochondria.* New York: Wiley, 1999.

Strauss, P. R. and Wilson, S. H. *The Eukaryotic Nucleus: Molecular Biochemistry and Macromolecular Assemblies.* Caldwell, NJ: Telford Press, 1990.

Tyler, D. D. *Mitochondrion in Health and Disease.* New York: VCH,1992.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Las células procarióticas pero no la eucarióticas, tienen:
   A. retículo endoplasmático.
   B. histonas.
   C. nucleoide.
   D. núcleo.
   E. membrana plasmática.

2. Entre los factores responsables de que la molécula de agua sea un dipolo se encuentra:
   A. la similitud de la afinidad por los electrones del hidrógeno y el oxígeno.
   B. la estructura tetraédrica del agua líquida.
   C. el valor del ángulo de enlace H—O—H.
   D. la capacidad del agua de unirse por puentes de hidrógeno a varias estructuras químicas.
   E. la diferencia entre la fuerza de los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes.

3. Los puentes de hidrógeno se establecen solamente entre átomos electronegativos, como el de oxígeno o nitrógeno, y un átomo de hidrógeno unido a:
   A. carbono.
   B. un átomo electronegativo.
   C. hidrógeno.
   D. iodo.
   E. azufre.

4. El producto iónico del agua:
   A. es independiente de la temperatura.
   B. tiene un valor numérico de 1×10^{-14} a 25°C.
   C. es la constante de equilibrio para la reacción $HOH \rightleftharpoons H^+ + OH^-$.
   D. implica que $[H^+]$ y $[OH^-]$ son siempre idénticas.
   E. es una aproximación que no tiene en cuenta la presencia del ión hidronio, H_3O^+.

5. ¿Cuál de los siguientes compuestos es tanto un ácido como una base de Brønsted en agua?
   A. $H_2PO_4^-$
   B. H_2CO_3
   C. NH_3
   D. NH_4^+
   E. Cl^-

6. Las membranas biológicas están relacionadas con los siguiente procesos, a EXCEPCIÓN de:
   A. impedir la libre difusión de solutos iónicos.
   B. liberar las proteínas que han sido dañadas.

C. contener sistemas específicos para el transporte de moléculas sin carga.
D. ser lugares en los que se realizan reacciones bioquímicas.
E. permitir que proteínas y ácidos nucleicos las atraviesen libremente.

7. El análisis de la composición de los principales compartimientos de fluido corporales muestra que:
   A. el principal catión del plasma sanguíneo es el K^+.
   B. el principal catión del fluido celular es el Na^+.
   C. uno de los principales aniones intracelulares es el Cl^-.
   D. uno de los principales aniones intracelulares es el fosfato.
   E. los fluidos plasmático y celular son muy parecidos en composición.

Los siguientes enunciados se refieren a las preguntas 8-10:

A. peroxisoma
B. núcleo
C. citoesqueleto
D. retículo endoplasmático
E. aparato de Golgi

8. Oxida ácidos grasos de cadena muy larga.
9. Está conectado a la membrana plasmática.
10. Transfiere precursores de glúcidos a las proteínas durante la síntesis de glucoproteínas.

Preguntas 11 y 12: Un paciente con la enfermedad de Luft presentaba un cuadro de debilidad general, sudoración excesiva, elevada ingesta calórica sin aumento de peso corporal y un metabolismo basal excesivamente elevado. La enfermedad de Luft fue la primera enfermedad descrita causada por una anomalía mitocondrial. Es un defecto en el mecanismo que controla la utilización del oxígeno en las mitocondrias.

11. Las mitocondrias están implicadas en los siguientes procesos, EXCEPTO:
    A. síntesis de ATP.
    B. síntesis de DNA
    C. síntesis de proteínas.
    D. hidrólisis de varias macromoléculas a pH bajo.
    E. apoptosis.

12. ¿Cuál o cuáles de los siguientes enunciados se refieren a características de las mitocondrias?
    A. La membrana interna forma crestas y contiene pequeñas esferas unidas por pedúnculos a la superficie interna.
    B. La membrana externa tiene permeabilidad altamente selectiva.
    C. Los componentes del sistema de transporte electrónico están localizados en el mitosol.
    D. El DNA mitocondrial es similar al DNA nuclear en tamaño y forma.
    E. Todos los enunciados anteriores son correctos.

Preguntas 13 y 14: la gota es una dolencia en la cual la excesiva producción de ácido úrico provoca el depósito de cristales de ácido úrico en las articulaciones. Entre las manifestaciones clínicas se cuentan la inflamación, el dolor y la hinchazón de las articulaciones, en particular la del dedo pulgar del pie. Los cristales son fagocitados por células presentes en la articulación y se acumulan en vacuolas digestivas que contienen enzimas lisosómicos. Los cristales dañan físicamente a las vacuolas, provocando la liberación de enzimas lisosómicos en el citosol.

13. Los enzimas lisosómicos
    A. son hidrolasas.
    B. normalmente actúan a pH ácido.
    C. normalmente están separadas de sus sustratos por la membrana impermeable lisosómica.
    D. pueden provocar la digestión celular si la membrana lisosómica se rompe a causa de estados patológicos o por acción de drogas.
    E. todos los enunciados anteriores son correctos.

14. En una serie de enfermedades genéticas, denominadas enfermedades de almacenamiento lisosómico, faltan enzimas lisosómicos individuales. En estas enfermedades:
    A. el defecto consiste en la incapacidad de dirigir los enzimas a los lisosomas después de la síntesis.
    B. los lisosomas de las células afectadas están engrosados con los materiales no digeridos.
    C. la lipofuscina, o "pigmento de desgaste", se acumula en las células.
    D. se acumula cualquier material introducido en los lisosomas.
    E. los cuerpos residuales contienen los productos de la digestión.

Problemas

15. Si un ácido débil está neutralizado en un 91% a pH 5,7, ¿cuál es el pK' del ácido?
16. La alcalosis metabólica es un estado en el cual el pH de la sangre es más alto que su valor normal de 7,40 y puede estar producida, entre otras causas, por un aumento de $[HCO_3^-]$. Si un paciente presenta los siguientes valores sanguíneos, pH = 7,45, $[CO_2]$ = 1,25 mM, ¿cuál es la $[HCO_3^-]$? El pK' para el sistema bicarbonato/ácido carbónico es de 6,1. ¿Cuál es la relación entre el valor calculado de bicarbonato y el valor normal?

RESPUESTAS

1. **C** El DNA procariótico está organizado en una estructura, que contiene también RNA y proteína, denominada nucleoide. A, B, y D se encuentran en las células eucarióticas, y E es un elemento tanto de las células procarióticas como eucarióticas.
2. **C** El agua es una molécula polar debido a que los electrones enlazantes son atraídos con más fuerza hacia el oxígeno que hacia el hidrógeno. El ángulo de enlace da lugar a una asimetría en la distribución de carga; si el agua fuera lineal, no sería un dipolo. A: El hidrógeno y el oxígeno tienen afinidades por los electrones muy diferentes. B y D son consecuencia de la estructura del agua, no factores responsables de ésta.
3. **B** Solamente los átomos de hidrógeno unidos a un elemento electronegativo (O, N, F) pueden formar enlaces de hidrógeno. Un átomo de hidrógeno que participe en un puente de hidrógeno debe tener un elemento electronegativo a ambos lados.
4. **B** La constante es función de la temperatura y es numéricamente igual a la constante de equilibrio para la disociación del agua dividida por la concentración molar del agua. D: $[H^+] = [OH^-]$ en agua pura, pero no en disoluciones de solutos que aporten H^+ u OH^-.
5. **A** El $H_2PO_4^-$ puede ceder un protón para convertirse en HPO_4^{2-}. También puede aceptar un protón para convertirse en H_3PO_4.

B y D son ácidos de Brønsted y C es una base de Brønsted. En agua el Cl^- no es ni lo uno ni lo otro.

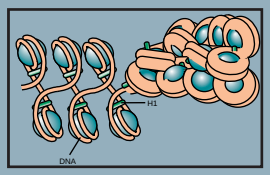
6. **E** Estas moléculas son demasiado grandes para cruzar la membrana libremente a menos que la membrana esté dañada. A: Los solutos iónicos no cruzan la membrana lipídica fácilmente. C: La mayoría de los sustratos requieren ser transportados a través de la membrana. D: Diferentes membranas tienen diferentes reacciones.
7. **D** El fosfato y las proteínas son los principales aniones intracelulares. A, B, E: El plasma y el fluido celular son radicalmente distintos. El Na^+ es el principal catión del plasma. C: La mayor parte del cloruro es extracelular.
8. **A** La oxidación de los ácidos grasos tiene lugar en las mitocondrias, pero los peroxisomas están involucrados en la oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga.
9. **B** Describe el citoesqueleto.
10. **E** Los lípidos también están unidos covalentemente a ciertas proteínas del aparato de Golgi.
11. **D** Esta es una función lisosómica. A: Esta es una función principal de las mitocondrias. B, C: Las mitocondrias sintetizan algunas de sus propias proteínas. E: El citocromo *c*, que forma parte de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, es un iniciador de la muerte celular programada.
12. **A** Es muy diferente de la membrana externa. B: La membrana interna es muy selectiva, la membrana externa es relativamente permeable. C: El sistema de transporte electrónico se encuentra en la membrana interna. D: El DNA mitocondrial (mtDNA) es pequeño y circular.
13. **E** Hay hidrolasas para todos los tipos de macromoléculas. B, D: El pH lisosómico es de aproximadamente 5 pero los enzimas mantienen alguna actividad a pH superior. C: Sustratos y enzimas se ponen en contacto por fagocitosis o pinocitosis.
14. **B** La congestión interfiere con los procesos celulares normales. A: Es una enfermedad celular que afecta todos los enzimas lisosómicos que son exportados por la célula. C: Es un proceso normal. La lipofuscina es una sustancia pigmentada químicamente heterogénea que no resulta de la falta de un enzima lisosómico. D: Cada enfermedad de almacenamiento lisosómico afecta a un solo enzima, por lo tanto solamente los sustratos de este enzima se verán afectados. E: Los cuerpos residuales contienen material no digerido.
15. Si un ácido débil se neutraliza en un 91%, 91 partes se encuentran como base conjugada y 9 partes permanecen como ácido no disociado. La relación base conjugada/ácido es pues aproximadamente 10:1. Sustituyendo en la ecuación de Henderson–Hasselbalch se obtiene $5{,}7 = pK' + \log (10/1)$. Despejando el pK' se obtiene el resultado de 4,7. Podría tratarse de ácido β-hidroxibutírico, un ácido de gran importancia fisiológica, que tiene este pK'.
16. Simplemente hay que sustituir los valores indicados en la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$7{,}45 = 6{,}1 + \log (x/1{,}25)$$
$$1{,}35 = \log (x/1{,}25)$$

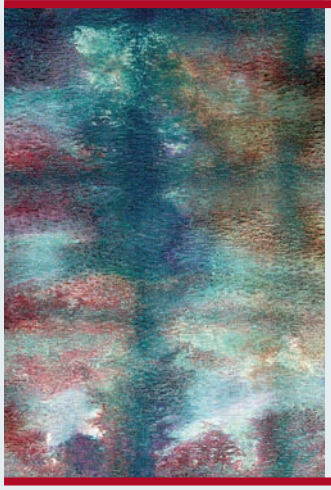
El antilog de 1,35 es 22,39. Por tanto

$$[HCO_3^-] = 22{,}39 \times 1{,}25 = 27{,}98 \text{ mM}$$

La $[HCO_3^-]$ normal es 24,0 mM, por tanto hay un aumento de 3,98 mmol (por litro) de HCO_3^-.



2



DNA Y RNA: COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA

Stephen A. Woski
y Francis J. Schmidt

2.1 VISIÓN GENERAL DEL DNA 28

El dogma central de la Biología molecular 28
El DNA puede transformar células 28
La capacidad de almacenamiento de información del DNA es enorme 29

2.2 COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: BASES, NUCLEÓSIDOS Y NUCLEÓTIDOS 29

Propiedades físicas de los nucleósidos y los nucleótidos 31
Propiedades estructurales de los nucleósidos y los nucleótidos 32

2.3 ESTRUCTURA DEL DNA 33

Estructura de los polinucleótidos 33
Conformación de los polinucleótidos 34
Estabilidad del esqueleto de los polinucleótidos 35
La doble hélice del DNA 36
Factores que estabilizan la doble hélice del DNA 41
Desnaturalización y renaturalización 42
Hibridación 44
Conformaciones del DNA de cadena doble 44
Estructuras no canónicas del DNA 48
DNA curvado 48
DNA cruciforme 49
DNA de triple hebra 50
DNA de hebra cuádruple 54
DNA deslizado 56

2.4 ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR DEL DNA 58

El DNA genómico puede ser lineal o circular 59
El DNA circular es superhelicoidal 60
Descripción geométrica del DNA superhelicoidal 62
Topoisomerasas 64
Empaquetamiento del DNA procariótico 66
Organización de la cromatina eucariótica 67
Nucleosomas y polinucleosomas 68
Empaquetamiento de los polinucleosomas en estructuras de orden superior 70

2.5 SECUENCIA Y FUNCIÓN DEL DNA 71

Endonucleasas de restricción y palíndromos 72
La mayor parte del DNA procariótico codifica proteínas específicas 73
Los genes funcionales solamente representan una pequeña parte del DNA eucariótico 74
Secuencias repetidas 75
DNA de copia única 76
DNA moderadamente reiterado 76
DNA altamente reiterado 76
DNA de repetición invertida 76

2.6 VISIÓN GENERAL DEL RNA 77

2.7 ESTRUCTURA DEL RNA 78

El RNA es un polímero de ribonucleósidos 5'-monofosfato 78
La estructura secundaria del RNA incorpora apareamiento de bases intramolecular 78
Las moléculas de RNA tienen estructura terciaria 79

2.8 TIPOS DE RNA 82

El RNA de transferencia tiene dos funciones: la activación de los aminoácidos y el reconocimiento de los codones del mRNA 82
El RNA ribosómico forma parte del aparato de la síntesis proteica 83
Los RNA mensajeros llevan la información de la estructura primaria de las proteínas 84
Las mitocondrias contienen especies de RNA únicas 85
RNA en partículas de ribonucleoproteína 86
RNA catalítico: Ribozimas 86
Los RNA pueden formar sitios de unión para otras macromoléculas 88

BIBLIOGRAFÍA 89

PREGUNTAS 89

RESPUESTAS 91

APLICACIONES CLÍNICAS

2.1 Vacunas de DNA 29
2.2 Uso diagnóstico de los chips de DNA en medicina y genética 45

2.3 Antibióticos antitumorales que cambian la forma del DNA 49
2.4 Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal 54
2.5 La telomerasa como diana de agentes anticancerígenos 56
2.6 Expansión de tripletes repetidos y enfermedades humanas 58
2.7 Uso de las topoisomerasas en el tratamiento de enfermedades 65
2.8 Resistencia de los estafilococos a la eritromicina 84

2.1 VISIÓN GENERAL DEL DNA

Una de las características más genuinas de la vida es su capacidad de reproducirse. La información que confiere a cada forma de vida individual sus características únicas debe ser protegida y transmitida a la descendencia. Todas las formas de vida existentes sobre la tierra utilizan los **ácidos nucleicos** para el almacenamiento de la información genética. A excepción de algunos virus, la biomolécula utilizada para el almacenamiento de la información es el **ácido desoxirribonucleico (DNA)**. Esta molécula está extraordinariamente bien dotada para esta tarea, a causa de su estabilidad química y por su capacidad para codificar grandes cantidades de información mediante un código sencillo de cuatro letras.

El dogma central de la Biología molecular

Por su función en el almacenamiento de la información genética, el DNA podría ser considerado como la biomolécula más importante de los sistemas biológicos. Sin embargo, el DNA es sólo una parte de la arquitectura básica de la vida. Otros dos tipos de macromoléculas, los **ácidos ribonucleicos (RNA)**, y las proteínas, juegan papeles igualmente importantes. La interrelación de estos tres tipos de moléculas constituye el "**dogma central de la biología molecular**" (Figura 2.1), según el cual el DNA almacena información que controla todos los procesos celulares. La mayor parte de la estructura y la bioquímica de la células se debe a sus proteínas. Estas propiedades están determinadas por la secuencia del DNA, que dirige la síntesis de proteínas. Sin embargo, la información no puede fluir directamente del DNA a la proteína, pues depende del ácido ribonucleico (RNA) para el transporte de la información. La información genética es traspasada del DNA al RNA en la **transcripción**. A continuación, la secuencia del RNA se **traduce** en una secuencia de proteína en los ribosomas. El DNA también juega un papel esencial en la herencia, al servir de molde para su propia **replicación**. Varios descubrimientos han comenzado a diluir los distintos papeles que el "dogma central" asigna a cada una de estas biomoléculas. Por ejemplo, se ha demostrado que el RNA puede actuar de catalizador de reacciones bioquímicas (**ribozimas**) y como molde para la síntesis de DNA (**transcripción inversa**). Además, el RNA es el componente activo de los ribosomas, la maquinaria de síntesis proteica de la célula. El DNA y el RNA interaccionan íntimamente con proteínas en muchas de las funciones que desempeñan, y se ha sugerido que las proteínas pueden almacenar información genética. Sin embargo, el papel central de los ácidos nucleicos en la vida está fuera de duda.

El DNA puede transformar células

Estos principios universalmente aceptados eran rechazados tajantemente no hace mucho tiempo. De hecho, antes de los años 1950 el punto de vista general era que

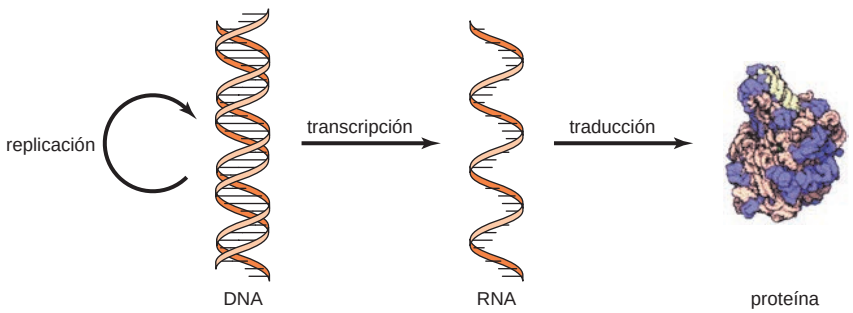
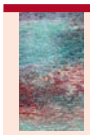


FIGURA 2.1
Dogma Central de la biología molecular.



APLICACIÓN CLÍNICA 2.1

Vacunas de DNA

Las vacunas tradicionales utilizan componentes purificados de un organismo infeccioso o bien células o virus intactos muertos o atenuados para estimular la producción de anticuerpos específicos en los individuos con inmunidad activa. Se han utilizado con éxito muchas vacunas que protegen frente a ciertas enfermedades como la polio, la viruela, la tosferina, la fiebre tifoidea y la difteria.

Recientemente se ha ensayado un nuevo tipo de inmunización con DNA "desnudo". La fuente del DNA es, normalmente, un plásmido bacteriano exento de proteínas bacterianas. El DNA puede entrar en un gran número de tipos celulares y expresarse en las células huésped. Este DNA codifica fragmentos antigénicos del patógeno, y los productos proteicos son sintetizados por la maquinaria celular de transcripción y traducción. Desde este punto de vista, las vacunas de DNA actúan de forma muy parecida a los virus. Sin embargo, estos DNA contienen una información genética muy limitada y no pueden ser infecciosos. Los mecanismos de captación e inducción de la respuesta inmune todavía se desconocen. Sin embargo, se han obtenido resultados prometedores con una serie de patógenos, entre los que se incluyen virus, bacterias y microorganismos parásitos. Esta metodología tiene muchas posibilidades para el tratamiento de enfermedades de difícil curación, tales como el VIH/SIDA, la tuberculosis y la malaria.

Lewis, P. J. y Babiuk, L. A. DNA vaccines: a review. *Adv. Virus Res.* 54:129, 1999.

los ácidos nucleicos eran sustancias de importancia celular limitada. Los primeros indicios de que el DNA era el material genético se hallaron durante los años 1920, pero la demostración definitiva del papel del DNA no se consiguió hasta 1944. Los experimentos clave emplearon dos cepas de neumococo, una bacteria que causa una de las formas de neumonía. En cultivo, una cepa formaba colonias lisas y la otra formaba colonias rugosas; fueron denominadas formas S y R, respectivamente. Estas dos formas son genéticamente distintas y no se pueden interconvertir de forma espontánea. El tratamiento de las bacterias de la forma R con DNA puro procedente de la forma S daba lugar a su **transformación** en la forma S. Además, la transformación se transmitía de forma estable a las generaciones posteriores. Se demostró así que el DNA era el agente transformante y también el material responsable de transmitir la información genética de una generación a la siguiente. La Apli. Clín. 2.1 describe vacunas basadas en la transformación de células de mamífero con DNA.

La capacidad de almacenamiento de información del DNA es enorme

Una de las características más llamativas del DNA es su capacidad de albergar una cantidad enorme de información biológica. Por ejemplo, una célula humana contiene información para sintetizar unas 50 000–100 000 proteínas. Esta información está almacenada en el núcleo celular, un orgánulo de apenas 0,00001 metros de diámetro. A pesar de tal grado de compactación, la información del DNA es fácilmente accesible y se duplica cuando conviene. La capacidad de almacenar grandes cantidades de información en moléculas y la de acceder a ella con tanta facilidad está aún por delante de las posibilidades de las modernas tecnologías de la información. La capacidad de los ácidos nucleicos de conservar y transmitir la información almacenada de manera eficiente se basa en su estructura química.

2.2 COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: BASES, NUCLEÓSIDOS Y NUCLEÓTIDOS

Los **ácidos nucleicos** son polímeros lineales cuya unidad repetitiva son los **nucleótidos**. Cada nucleótido consta de tres componentes: un éster fosfórico, un azúcar de la clase de las pentosas y una base heterocíclica. En el RNA el azúcar es la **D-ribosa**, mientras que en el DNA se encuentra un azúcar parecido, la **2-desoxi-D-ribosa**. En ambos casos la base está unida a la posición 1 del azúcar mediante un enlace β-*N*-glucosídico. En los ácidos nucleicos se encuentran dos clases principales de bases: las **purinas** y las **pirimidinas** (Figura 2.2). Las purinas más abundantes son la **guanina** y la **adenina**, que se encuentran tanto en el DNA como en el RNA y se hallan unidas al azúcar en la posición N-9. Hay tres bases pirimidínicas principales: la **citosina**, el **uracilo** y la **timina**. La citosina está presente tanto en el DNA

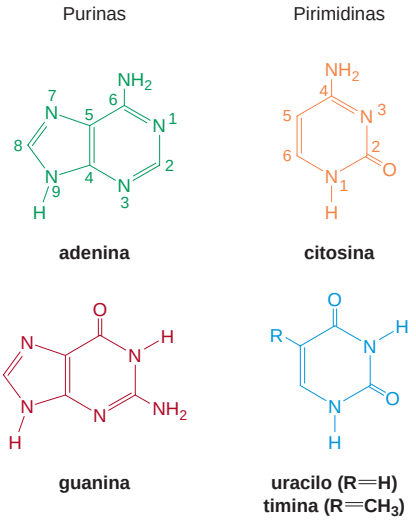


FIGURA 2.2
Principales bases púricas y pirimidínicas del DNA y el RNA.

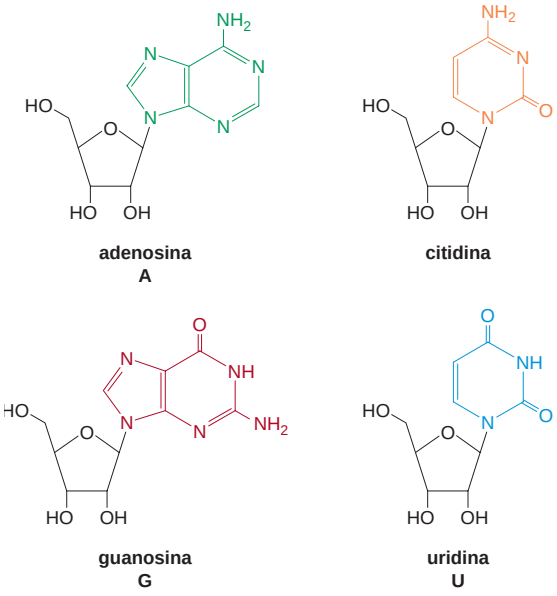


FIGURA 2.3
Estructuras de los ribonucleósidos.
Se indican las abreviaturas de una sola letra de cada compuesto. Estas abreviaturas también se usan para las correspondientes bases y nucleótidos y, en algunos casos, para los desoxirribonucleósidos.

como en el RNA. Sin embargo, el uracilo generalmente sólo se encuentra en el RNA, y la timina sólo en el DNA. Las pirimidinas están unidas al azúcar en la posición N-1. Una base glucosilada con cualquiera de las pentosas se denomina **nucleósido**. Los nucleósidos que contienen ribosa se designan como **ribonucleósidos** (Figura 2.3), mientras que aquellos que contienen desoxirribosa son **desoxirribonucleósidos** (Figura 2.4). En el RNA son comunes cuatro ribonucleósidos: **adenosina (A), guanosina (G), citidina (C) y uridina (U)**.En el DNA son comunes cuatro desoxirribonucleósidos: **desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG), desoxicitidina (dC) y desoxitimidina (dT)**. Además de estos nucleósidos, se han encontrado más de 80 nucleósidos minoritarios en los ácidos nucleicos naturales.

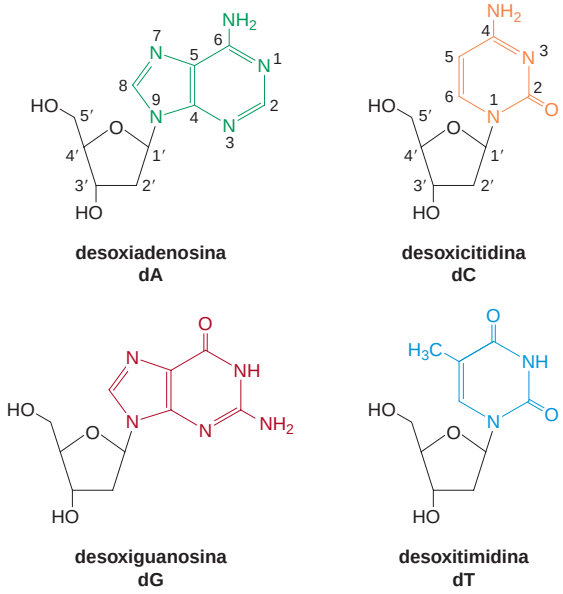
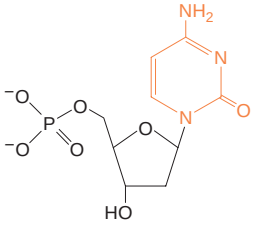
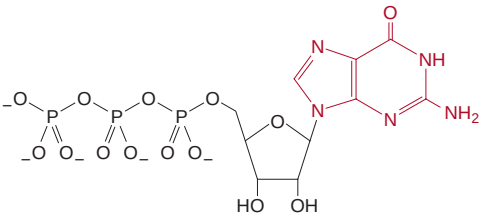


FIGURA 2.4
Estructuras de los desoxirribonucleósidos.
La presencia de 2-desoxirribosa se abrevia con una "d" delante de la notación de una letra. Obsérvese que algunas fuentes bibliográficas usan timidina (T) de forma intercambiable con desoxitimidina (dT).

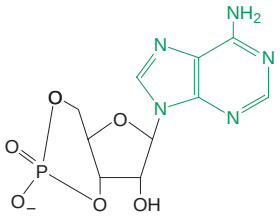
Los **nucleótidos** son ésteres fosfóricos de los nucleósidos (Figura 2.5). Cualquiera de los grupos hidroxilo de los azúcares de los nucleósidos puede ser fosforilado, pero las bases generalmente no lo están. Los nucleótidos con un solo éster fosfórico se denominan nucleósido monofosfatos. Por ejemplo, el 5′-nucleótido de la desoxicitidina se denomina desoxicitidina 5′-monofosfato (5′-dCPM). Más de un fosfato puede estar unido por un enlace anhídrido, dando los correspondientes ésteres di-, tri- y tetrafosfato. El 5′-trifosfato de guanosina sería la guanosina 5′-trifosfato (GTP). También son posibles los diésteres fosfóricos; entre ellos se encuentran los importantes "segundos mensajeros" adenosina-3′,5′-monofosfato cíclico (cAMP) y guanosina-3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP).



desoxicitidina 5′-monofosfato
dCMP



guanosina 5′-trifosfato
GTP



adenosina 3′,5′- monofosfato cíclico
cAMP

FIGURA 2.5
Estructuras de algunos nucleótidos representativos.

Propiedades físicas de los nucleósidos y los nucleótidos

Las nucleobases, los nucleósidos y los nucleótidos son en mayor o menor medida solubles en agua en un amplio intervalo de valores de pH. A consecuencia de la naturaleza hidrofílica de los azúcares, los nucleósidos son más solubles que las bases correspondientes. Sin embargo, a valores de pH biológicamente relevantes (pH 5-9), los nucleósidos son especies neutras. A pH bajo, las nucleobases que contienen grupos amino (G, C, A) están protonadas. Los lugares de protonación no son los grupos NH_2 exocíclicos, sino los nitrógenos del anillo. La protonación de estos sitios impide la pérdida del carácter aromático del sistema heterocíclico y mantiene la conjugación del par electrónico desapareado de los grupos amino hibridados por sp^2 con el heterociclo. Los grupos hidroxilo de la pentosa son bases muy débiles que sólo se desprotonan significativamente a valores de pH muy altos (>12).

Un incremento adicional de la solubilidad en agua resulta de la fosforilación de los nucleósidos. El pK_a del los mono- y diésteres fosfóricos es de ~1; por lo tanto, los fosfatos tienen una carga negativa a valores de pH fisiológicos. El segundo pK_a de un monoéster fosfato es de ~6,5; hay, pues, un equilibrio entre el monoanión y el dianión a pH cercanos a la neutralidad. Los nucleótidos con dos y tres grupos fosfato llevan múltiples cargas negativas. Las cargas negativas de los grupos fosfato de los nucleótidos posibilitan las interacciones electrostáticas con sitios cargados positivamente de proteínas y iones metálicos.

Los nucleósidos y los nucleótidos son estables en un amplio intervalo de valores de pH. La hidrólisis de los ésteres fosfóricos se produce en condiciones fuertemente básicas. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis está disminuida por la repulsión electrostática entre los fosfatos cargados negativamente y los grupos hidroxilo, también cargados negativamente. Los enlaces *N*-glucosídicos de los nucleósidos y nucleótidos son estables en estas condiciones, pero son mucho más lábiles en condiciones ácidas. Además, la protonación de las bases púricas (G y A) a elevada temperatura provoca una rápida rotura del enlace entre el azúcar y la base. Los nucleósidos de pirimidina (C, T, U) y los nucleótidos son mucho más resistentes al tratamiento con ácido. Las condiciones que provocan la rotura del enlace glucosídico (p. ej., 60% ácido perclórico a 100ºC) también causan la destrucción del azúcar.

Las moléculas que contienen bases púricas o pirimidínicas absorben fuertemente la luz ultravioleta (UV). Las purinas y los nucleósidos y nucleótidos que contienen purinas tienen **coeficientes de extinción molar** mayores (absorben la luz más intensamente) que los derivados de las pirimidinas. La longitud de onda del máximo de absorción depende de la base, pero normalmente es próxima a los 260 nm. Puesto que las proteínas y otros componentes celulares normalmente no absorben fuertemente en esta región, una absorbancia intensa a 260 nm indica la presencia de nucleobases. Los elevados coeficientes de extinción de la bases púricas y pirimidínicas y su elevada concentración en los ácidos nucleicos permite utilizar la absorbancia a 260 nm para medir con precisión la cantidad de ácidos nucleicos (DNA o RNA) presentes en una muestra. Diversas técnicas cromatográficas, entre las que se encuentran la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía en papel y la electroforesis, permiten el análisis ulterior y la separación de las nucleobases, los nucleósidos y los nucleótidos.

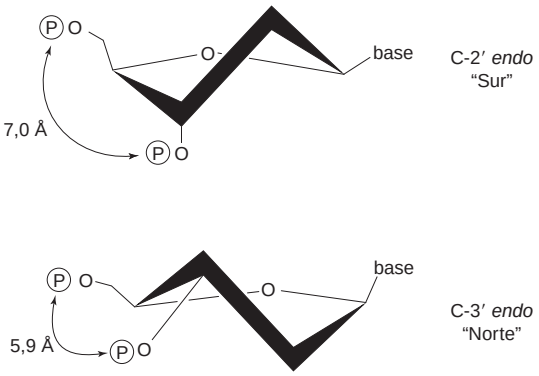


FIGURA 2.6
Conformaciones preferidas de las pentosas.
Las dos conformaciones producen cambios en la orientación relativa de la base (con relación al azúcar) y en la distancia entre los fosfatos 3′ y 5′(P). Estas diferencias afectan, en última instancia, a la conformación global de la doble hélice.

Propiedades estructurales de los nucleósidos y los nucleótidos

Una notable propiedad de los nucleósidos y nucleótidos es el considerable número de conformaciones que pueden adoptar. A diferencia de los anillos hexagonales (ciclohexanos), con barreras conformacionales relativamente elevadas, los anillos pentagonales son muy flexibles. Los cinco átomos del anillo de un azúcar pentosa no son coplanares debido a que esta conformación da lugar a interacciones especiales desfavorables entre los grupos unidos al anillo. Para paliar la situación, uno o dos átomos del anillo salen del plano. En los anillos de ciclopentano hay varias conformaciones en "sobre" y "media silla" en rápida interconversión. La asimetría del patrón de sustitución del anillo de la pentosa favorece dos conformaciones (Figura 2.6). Esta dos formas de **ahuecamiento del azúcar** se definen por el desplazamiento de los carbonos 2′ y 3′ por encima del plano definido por los átomos C-1′–O-4′–C-4′. Por convención, "encima" es la dirección en la cual la base y el C-5′ se proyectan fuera del anillo, y ésta es la cara ***endo*** de la pentosa. Si el C-2′ está desplazado por encima del anillo de la pentosa, la conformación se denomina **C-2′ *endo***. Vistos a lo largo del borde, los átomos de carbono de la pentosa en esta disposición se parecen a la letra **S**; por eso esta conformación a veces se denomina conformación S o conformación Sur. En el segundo ahuecamiento más común el C-3′ está desplazado hacia la cara endo y se denomina **C-3′ *endo***. Los átomos de carbono de la pentosa trazan la letra **N**, por lo que esta conformación a veces se denomina conformación N o conformación Norte. Es de destacar que los grupos unidos al azúcar tienen orientaciones muy diferentes en cada una de estas conformaciones. Por ejemplo, los grupos 5′- y 3′-fosfato están mucho más separados en el ahuecamiento C-2′ *endo* que en el ahuecamiento C-3′ *endo*. La orientación del enlace glucosídico también cambia significativamente en las dos conformaciones.

Las conformaciones C-2′ *endo* y C-3′ *endo* se encuentran generalmente en rápido equilibrio. La presencia de un sustituyente electronegativo en la posición 2′ de la pentosa favorece la conformación C-3′ *endo*. Los ribonucleósidos del RNA prefieren, pues, esta conformación. En el RNA, factores tales como la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo 2′-OH y el átomo O-4′ del residuo vecino también desplazan el equilibrio hacia la conformación C-3′ *endo*. En cambio, los 2′-desoxinucleósidos del DNA contienen un hidrógeno en lugar del grupo 2′-OH, y la conformación preferida es la C-2′ *endo*.

Las bases de los nucleósidos son planas. Aunque hay libertad de rotación en torno del enlace glucosídico, hay dos orientaciones predominantes de la base en relación con el azúcar (Figura 2.7). En las purinas, la **conformación *anti*** coloca el H-8 sobre el azúcar, mientras que la **conformación *syn*** coloca este átomo lejos del azúcar y el conjunto de la purina bicíclica sobre éste. En las pirimidinas, el átomo H-6 se encuentra sobre el anillo de la pentosa en la conformación *anti*, mientras que en la conformación *syn* el átomo O-2, de mayor tamaño, se encuentra sobre el anillo. Las pirimidinas, por lo tanto, muestran una mayor preferencia por la conformación *anti*, menos restringida estéricamente. Las purinas se interconvierten rápidamente entre las dos conformaciones, pero prefieren la orientación *anti*. Sin embargo, los 5′-nucleótidos de guanina son la excepción. En este caso, las interacciones favorables entre el grupo 2-NH_2 y el grupo 5′-fosfato estabilizan la conformación *syn*. La 2′-desoxiguanosina 5′-monofosfato (dGMP), por ejemplo,

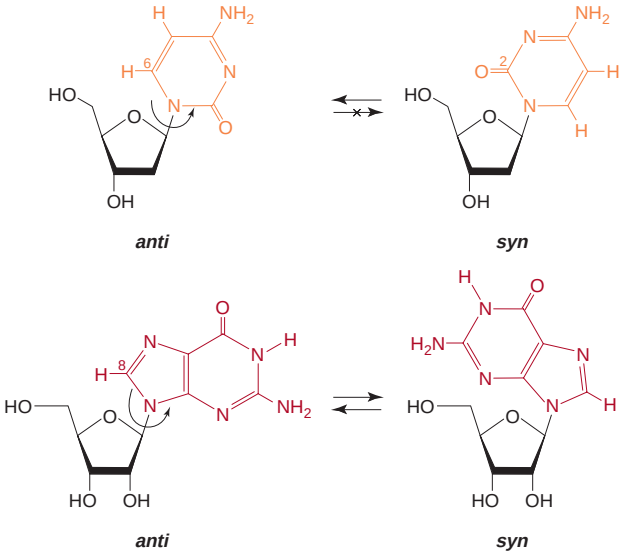


FIGURA 2.7
Conformaciones del enlace glucosídico de las purinas y las pirimidinas. En las pirimidinas, el choque estérico entre el azúcar y el O-2 de la base obstaculiza la conformación *syn*. En las purinas, las conformaciones *syn* y *anti* se interconvierten fácilmente, aunque la *anti* es en general más estable. La conformación *syn* está estabilizada en la guanosina 5′-fosfato a causa de las interacciones favorables entre el grupo 2-NH_2 y los oxígenos del fosfato.

prefiere la conformación *syn*. Esta conformación también se ha observado en los DNA de cadena doble con G y C alternantes. La conformación *syn* de los residuos de G en estos DNA da lugar a la formación de una poco habitual hélice levógira (véase p. 47).

2.3 ESTRUCTURA DEL DNA

Estructura de los polinucleótidos

Los ácidos nucleicos son cadenas de nucleósidos unidos por **enlaces fosfodiéster** (Figura 2.8). La longitud de las cadenas varía considerablemente, desde dos resi-

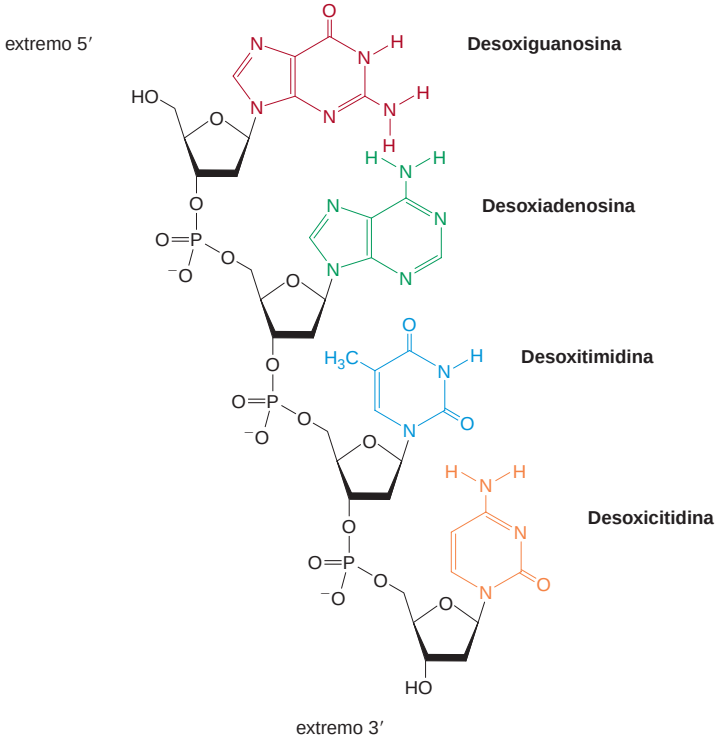


FIGURA 2.8
Estructura de un segmento de polinucleótido de DNA. El ejemplo que se muestran es un tetranucleótido. Generalmente, los ácidos nucleicos de menos de 50 nucleótidos se denominan oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos más largos se denominan polinucleótidos.

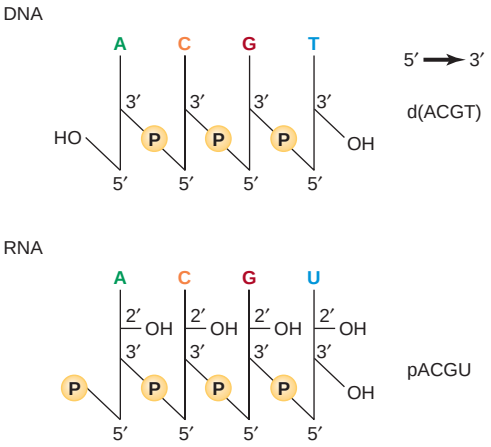


FIGURA 2.9
Representaciones taquigráficas de la estructura de los oligonucleótidos.
La convención utilizada en la escritura de la estructura de un oligo- o de un polinucleótido es una línea perpendicular que representa la porción de azúcar con la posición 5′-OH del azúcar situada en la parte inferior de la línea y la posición 3′-OH (y la 2′-OH, en caso de estar presente) en la mitad. Las barras que unen las posiciones 3′ y 5′ representan el enlace 3′, 5′-fosfodiéster y la P a la izquierda o en el lado derecho de la barra perpendicular representa un éster 5′-fosfato o 3′-fosfato, respectivamente. La base se representa por su inicial en la parte superior de la barra. Una forma taquigráfica alternativa consiste en usar las iniciales de las bases escritas en la dirección 5′ → 3′ de izquierda a derecha. Los grupos fosfodiéster internos no están representados, y los fosfatos terminales se indican con una "p". Las secuencias oligonucleotídicas que contienen desoxirribosa van precedidas de una "d".

duos a millares e incluso millones de residuos. Las cadenas de los ácidos nucleicos que contienen ≤50 nucleótidos suelen denominarse **oligonucleótidos**, mientras que las más largas se denominan **polinúcleótidos**. El enlace fosfodiéster une el grupo 5′-hidroxilo de un residuo al 3′-hidroxilo del siguiente. Los enlaces entre dos 5′-OH o dos 3′-OH no están presentes en los DNA o RNA naturales. La **direccionalidad** del enlace fosfodiéster implica que los extremos de los oligo- o polinucleótidos no son estructuralmente equivalentes. Si un extremo de un polinucleótido termina en un 5′-OH, el otro termina en un 3′-OH. Estos extremos se conocen como **extremo 5′** y **extremo 3′**, respectivamente. Uno o ambos extremos de muchos polinucleótidos están químicamente modificados con grupos fosfato o aminoácidos. Los polinucleótidos circulares no tienen extremos libres y están formados por la unión del extremo 5′ de un polinucleótido lineal con su propio extremo 3′ mediante un enlace fosfodiéster.

Tanto en los polinucleótidos lineales como en los circulares, la cadena azúcar-fosfodiéster es muy uniforme y la diversidad química procede sólo de las bases. Más concretamente, la **secuencia** de bases de un polinucleótido confiere a la molécula una identidad química propia (Figura 2.9). Esta disposición es similar a la de los polipéptidos y proteínas (véase el Capítulo 3), donde las variaciones de la estructura química proceden básicamente de las características de las cadenas laterales de los aminoácidos.

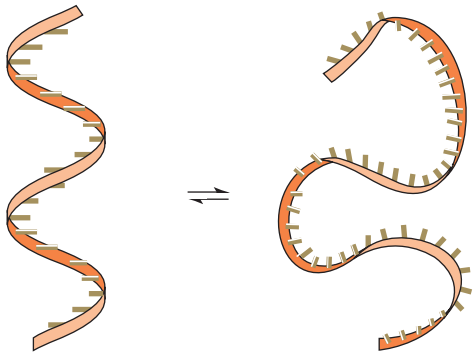


FIGURA 2.10
Conformaciones apilada y en ovillo estadístico de un polinucleótido de hebra sencilla.
La banda helicoidal representa el esqueleto de azúcar-fosfato del polinucleótido. Las bases se muestran en vista lateral como líneas gruesas en estrecho contacto con sus vecinas, por encima y por debajo de cada base. El desapilamiento de las bases aumenta la flexibilidad de la estructura con las bases orientadas al azar.

Conformación de los polinucleótidos

Las bases son en gran medida responsables de la conformación de los polinucleótidos. Los bordes de las bases contienen átomos de nitrógeno y oxígeno (grupos $—NH_2$, $=N—$ y $=O$) que pueden interaccionar con otros grupos polares o con las moléculas de agua del medio. Sin embargo, las caras de los anillos no pueden participar en tales interacciones y tienden a evitar el contacto con el agua. En cambio, interaccionan entre sí por apilamiento. El **apilamiento de bases** reduce la superficie hidrofóbica en contacto con el agua. La liberación de moléculas de agua al solvente es entrópicamente favorable. El apilamiento de las bases también está estabilizado por interacciones electrónicas favorables (fuerzas de van der Waals). Como otros sistemas aromáticos, las bases poseen **orbitales** π muy deslocalizados por encima y por debajo de los planos de los anillos. La densidad electrónica de estos orbitales puede ser polarizada por dipolos cercanos. Los dipolos inducidos resultantes pueden entonces interaccionar con el grupo polarizante de forma energéticamente favorable. Estas interacciones débiles son reforzadas todavía más por las **fuerzas de dispersión de London** (dipolo inducido-dipolo inducido). Debido a que la fuerza de estas interacciones electrónicas es muy dependiente de la distancia, no queda espacio vacío entre las bases apiladas.

Los polinucleótidos adoptan conformaciones que favorecen al máximo las interacciones de apilamiento entre las bases vecinas. Las exigencias de la estructura de la cadena azúcar-fosfodiéster favorecen las estructuras helicoidales (Figura 2.10). La estabilidad global de estas estructuras helicoidales depende de diversos factores,

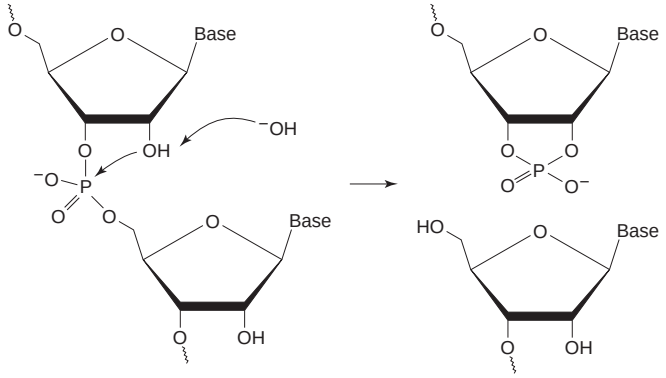


FIGURA 2.11
La hidrólisis del RNA es acelerada por la participación del grupo 2′-OH.
El ataque nucleofílico intramolecular por el grupo 2′-OH de la ribosa aumenta mucho la velocidad de rotura hidrolítica del esqueleto fosfodiéster, especialmente en condiciones alcalinas. El fosfodiéster 2′,3′-cíclico resultante puede reaccionar a continuación con agua o hidróxido para dar una mezcla de monoésteres 2′ y 3′-fosfato.

entre los cuales se encuentran el apilamiento de las bases dependiente de secuencia, el pH, la concentración de sal y la temperatura. Por ejemplo, algunos polinucleótidos sintéticos, como el poli(C) y el poli(A), forman hélices dextrógiras con las bases muy bien apiladas. En cambio, muchos otros polinucleótidos se encuentran desordenados en disolución, una conformación denominada **ovillo estadístico**. Los grandes polinucleótidos con secuencias al azar tienen a la vez zonas helicoidales y desordenadas según la secuencia local. La adopción de estructuras apiladas por parte de los polinucleótidos también depende de las características de la disolución. Por ejemplo, las concentraciones altas de cationes, especialmente algunos cationes divalentes como el Mg^{2+}, estabilizan la conformación helicoidal de los polinucleótidos al apantallar las cargas de los grupos fosfodiéster de la cadena. Sin apantallamiento, la repulsión electrostática entre las cargas negativas de los fosfatos desestabilizaría la hélice.

Estabilidad del esqueleto de los polinucleótidos

Los polinucleótidos son relativamente estables en disolución acuosa a pH neutro. Se ha estimado que la vida media de los enlaces fosfodiéster frente a la hidrólisis es de unos 200 millones de años. Esta gran estabilidad hace que el DNA sea adecuado para el almacenamiento a largo plazo de la información genética. En cambio, el RNA se hidroliza mucho más fácilmente. La presencia del grupo 2′-OH suministra un nucleófilo interno para la transesterificación del enlace 3′,5′-fosfodiéster (Figura 2.11). El resultado es la rotura de la cadena polinucleotídica, que deja un fosfato 2′,3′ cíclico en uno de los fragmentos y un grupo 5′-OH libre en el otro. La mayor labilidad del RNA frente a la hidrólisis lo hace menos adecuado como material genético que el DNA.

Aunque la cadena del DNA es relativamente estable frente a la hidrólisis, numerosos enzimas catalizan la rotura del enlace fosfodiéster. Estos enzimas, denominados nucleasas, se clasifican según el tipo de polinucleótido que hidrolizan y los enlaces que se rompen. (Figura 2.12). Por ejemplo, las **exonucleasas** escinden el último residuo nucleotídico en el extremo 5′- o 3′- de un polinucleótido. La eliminación secuencial de nucleótidos individuales de un extremo de un polinucleótido puede acabar con su completa degradación. Las nucleasas pueden cortar uno u otro de los dos enlaces no equivalentes de un enlace fosfodiéster, dejando tanto un grupo 5′-OH libre y uno 3′-fosfato como uno 5′-fosfato y uno 3′-OH. Por ejemplo, el tratamiento de un oligodesoxirribonucleótido con fosfodiesterasa de veneno de serpiente produce desoxirribonucleótidos 5′-fosfato. En cambio, el tratamiento con fosfodiesterasa de bazo produce desoxirribonucleótidos 3′-fosfato.

Otras nucleasas que cortan los enlaces fosfodiéster situados en el interior de los polinucleótidos se denominan **endonucleasas**. Estos enzimas no requieren un extremo libre; por lo tanto pueden cortar polinucleótidos circulares. Las endonuclea-

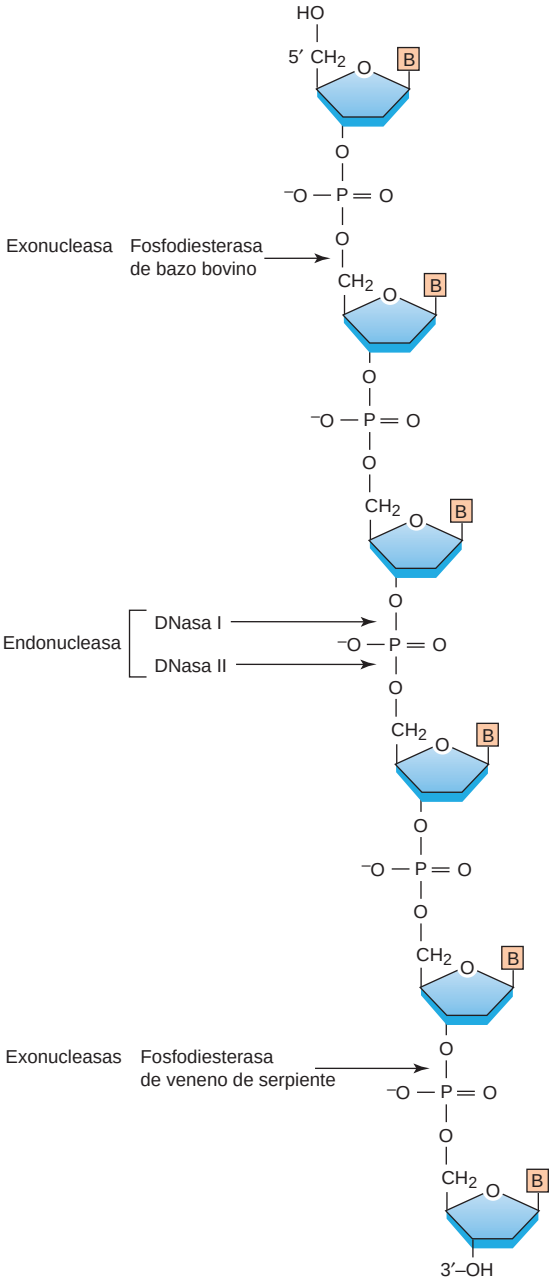


FIGURA 2.12
Especificidad de las nucleasas.
Las exonucleasas eliminan residuos nucleotídicos de cualquiera de los extremos de un polinucleótido, según su especificidad. Las endonucleasas hidrolizan enlaces fosfodiéster internos. Tanto las endo- como las exonucleasas muestran especificidad en relación con el enlace oxígeno-fósforo que es hidrolizado.

sas como la DNasa I y la DNasa II hidrolizan el DNA con poca especificidad de secuencia. Otros enzimas, las **endonucleasas de restricción**, reconocen y cortan secuencias muy específicas. Las endonucleasas de restricción han sido muy útiles en el desarrollo de metodologías para secuenciar polinucleótidos de DNA y están en la base de las técnicas del DNA recombinante. Las nucleasas también muestran especificidad en relación con la estructura global de los polinucleótidos. Por ejemplo, algunas nucleasas actúan tanto sobre polinucleótidos de cadena simple como de cadena doble, mientras que otras discriminan entre estas dos estructuras. Algunas nucleasas actúan tanto sobre DNA como RNA, mientras que otras actúan sobre un solo tipo de polinucleótido.

La doble hélice del DNA

Con la aceptación a mediados del siglo XX de que el DNA era el transportador de la información genética, los esfuerzos para conocer las bases estructurales del al-

macenamiento de la información se intensificaron. Sin embargo, varias creencias erróneas dificultaron el progreso. La primera fue la observación experimental (equivocada) de que el DNA contenía cantidades iguales de cada uno de los cuatro nucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina y desoxitimidina). La propuesta de que el DNA consistía en un tetranucleótido cíclico que contenía un nucleósido de cada tipo se basaba en esta suposición (Figura 2.13). Está estructura chocó frontalmente con el hallazgo de que el DNA tenía una masa molecular millares de veces superior que la de un tetranucleótido. Era difícil imaginar cómo una estructura monótona de tetranucleótidos repetidos podía poseer suficiente complejidad para almacenar la enorme variedad de caracteres hereditarios.

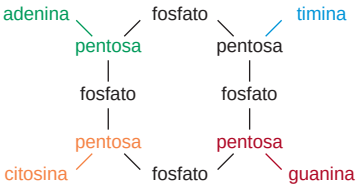


FIGURA 2.13
Estructura del DNA basada en un tetranucleótido propuesta en los años 1930.

Experimentos de síntesis y de difracción de rayos X permitieron concluir que el DNA tenía una estructura lineal. Sin embargo, la estructura tridimensional del DNA era todavía un misterio. Tres datos clave fueron necesarios para deducir la estructura del DNA. El primero fue la aceptación de que el DNA no poseía cantidades iguales de los cuatro nucleósidos, y que las cantidades variaban según el organismo. Sin embargo, una relación que resultó ser verdadera fue que la abundancia de desoxiadenosina era siempre igual a la de desoxitimidina y que la abundancia de desoxiguanosina era siempre igual a la de desoxicitidina. Estos resultados llevaron a proponer estructuras con apareamientos específicos entre las bases (dA con dT y dG con dC). El segundo fue la posibilidad, apoyada por los datos de difracción de rayos X, de que el DNA contuviera estructuras en **doble hélice**, y que las dos cadenas, por consideraciones de simetría, fuesen **antiparalelas**. La última pieza del rompecabezas fue la sugerencia de que las bases se encontrasen en las **formas tautoméricas** ceto y amino, en lugar de las formas enol e imino. Los tautómeros son isómeros de una molécula que difieren sólo en la posición de un átomo de hidrógeno. Cada una de la bases presenta dos o más posibles formas tautoméricas que se encuentran en equilibrio (Figura 2.14). La asignación incorrecta de las estructuras tautoméricas predominantes significó que los investigadores trataran de formar

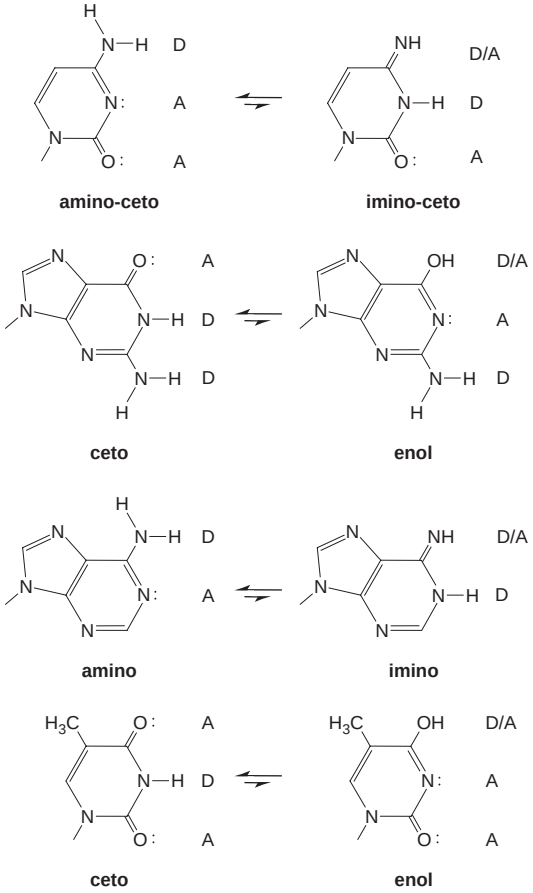


FIGURA 2.14
Formas tautoméricas de las bases.
El patrón de grupos dadores (D) y aceptores (A) en los puentes de hidrógeno cambia según la forma tautomérica. Se muestra la forma tautomérica predominante (izquierda) y una de las formas alternativas (derecha) para cada base. También se muestra el patrón de puentes de hidrógeno de cada tautómero; la ambigüedad en las posiciones —OH y ═NH de los tautómeros minoritarios procede de la rotación o isomerismo de estos grupos. La relación de equilibrio de la forma predominante respecto a todas las demás es mayor que 99:1.

pares de bases mediante patrones de puentes de hidrógeno incorrectos. Con los tautómeros correctos se encontró rápidamente el modelo correcto del DNA.

La estructura que Watson y Crick propusieron en 1953 para la **doble hélice del DNA** era muy atractiva por su simplicidad y simetría (Figura 2.15). Además, explicaba todos los datos disponibles sobre la estructura del DNA e inmediatamente sugirió cuál podía ser el mecanismo de almacenamiento de la información genética. La doble hélice de Watson y Crick resulta del enrollamiento de dos hebras polinucleotídicas dextrógiras una en torno a la otra alrededor de un eje común. Las dos hebras están asociadas a través de puentes de hidrógeno, formados en los bordes hidrofílicos de las bases. Los grupos N—H son buenos dadores de puentes de hidrógeno y los pares de electrones de los orbitales sp^2 de los oxígenos de los grupos C═O y los nitrógenos de los grupos ═N— son buenos aceptores de puentes de hidrógeno. El apareamiento ocurre cuando un aceptor y un dador se encuentran en la posición correcta para formar un puente de hidrógeno. Estos enlaces se establecen entre residuos de purina de una hebra y residuos de pirimidina de la otra, y el encaje de los dadores y aceptores de puentes de hidrógeno da lugar a dos tipos de **pares de bases**: adenina-timina y guanina-citosina (Figura 2.16). Una consecuencia directa de estas especificidades en la formación de puentes de hidrógeno es que la **doble hélice del DNA** (**dsDNA**) debe contener las proporciones de nucleósidos que se observan experimentalmente (dA = dT y dG = dC). Finalmente, las geometrías de los pares de bases dA/dT y dG/dC resultan en distancias C-1′–C-1′ similares (~10,6 Å) y orientaciones del enlace glucosídico también similares. Este **isomorfismo estructural** significa que cualquiera de los cuatro posibles pares de bases (dA-dT, dT-dA, dG-dC, dC-dG) puede ser insertado en la doble hélice sin cambiar la geometría de las cadenas azúcar-fosfato.

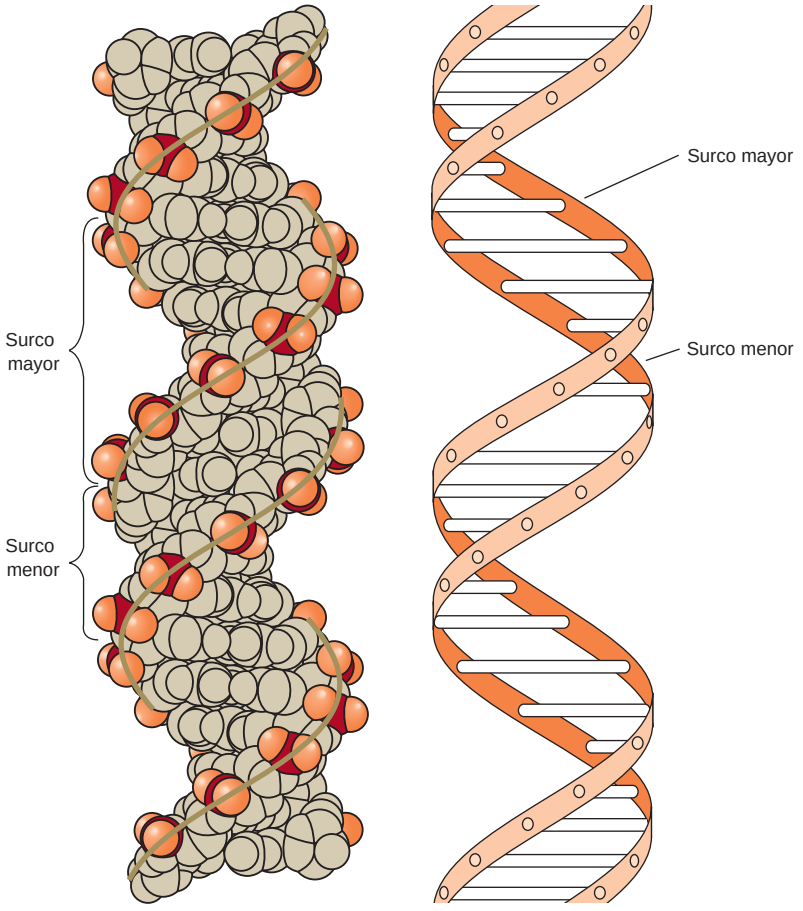


FIGURA 2.15
El modelo de Watson y Crick del DNA.
A la izquierda se muestra un modelo espacial del DNA; a la derecha se muestra un modelo idealizado de cinta. Las bases están apiladas en el interior de la hélice, mientras que el esqueleto hidrofílico azúcar-fosfato se encuentra en el exterior.
Adaptado de Rich, A. J. Biomol. Struct. Dyn. *1:1, 1983.*

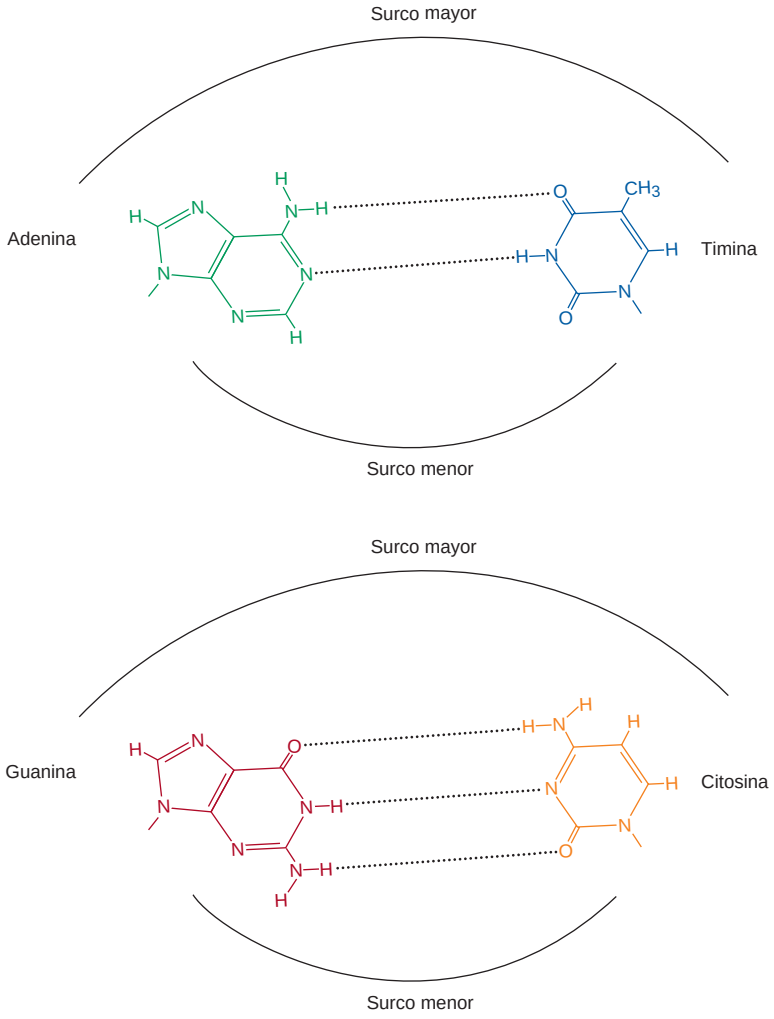


FIGURA 2.16
Los pares de bases de Watson y Crick.
Se forman pares de bases selectivos entre la adenina y la timina y entre la guanina y la citosina.

Esta relación entre las bases de la doble hélice se designa como **complementariedad**. Las bases son complementarias porque cada base de una de las cadenas está apareada por puentes de hidrógeno con la base complementaria de la otra cadena (Figura 2.17). Por ejemplo, para cada adenina que se proyecta hacia el eje común de la doble hélice, debe proyectarse una timina desde la cadena opuesta para llenar exactamente el espacio entre las cadenas formando puentes de hidrógeno con la adenina. Ni la citosina ni la guanina encajan con precisión en el espacio disponible en la prolongación de la adenina, de modo que no es posible la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas. Estas **especificidades en la formación de los puentes de hidrógeno** aseguran que la secuencia completa de una cadena sea complementaria de la secuencia de la otra cadena.

El exterior de la doble hélice está constituido por las cadenas azúcar-fosfato de las hebras antiparalelas del DNA. Los polinucleótidos son estructuras asimétricas con polaridad intrínseca. Las dos hebras están alineadas en direcciones opuestas; si dos bases adyacentes de la misma cadena, por ejemplo, timina y citosina, están conectadas en la dirección $5' \rightarrow 3'$, sus bases complementarias, adenina y guanina estarán unidas en la dirección $3' \rightarrow 5'$. Este alineamiento antiparalelo produce una asociación estable entre las cadenas, que excluye el alineamiento paralelo alternativo.

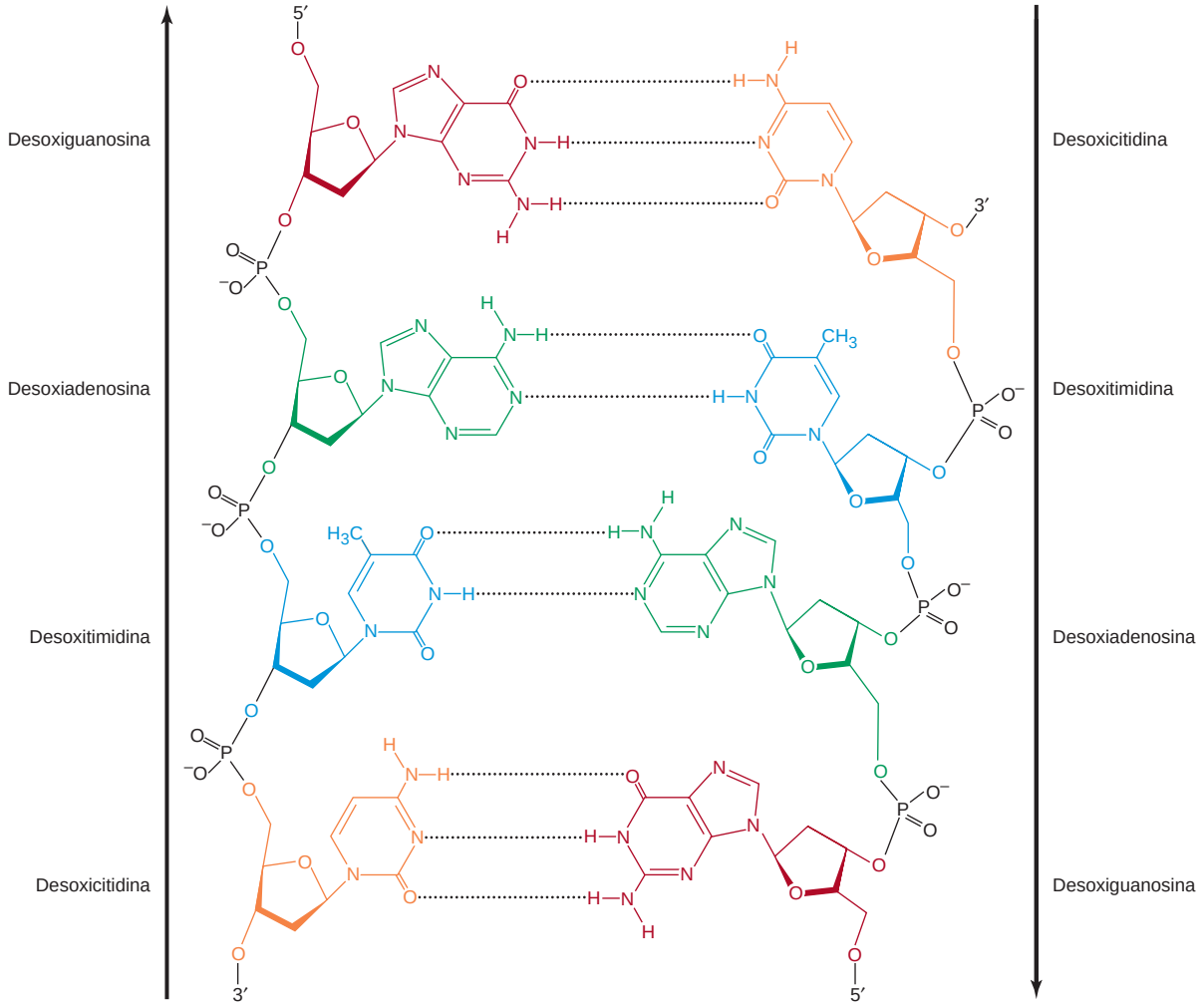


FIGURA 2.17
Formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias en el DNA de doble hebra.

La interacción entre las hebras polinucleotídicas es muy selectiva. La complementariedad no sólo depende de factores geométricos que permiten el encaje adecuado entre las bases complementarias de las dos hebras, sino también de la formación de puentes de hidrógeno específicos entre las bases complementarias. Obsérvese la orientación antiparalela de las cadenas del DNA de doble hebra. La geometría de la hélice no impide el alineamiento paralelo, pero esta disposición no se ha observado en el DNA.

El entrelazado de las dos hebras antiparalelas produce una estructura que tiene dos surcos helicoidales distintos entre las cadenas azúcar-fosfato (Figura 2.15). Uno de los surcos es más ancho (**surco mayor**) que el otro (**surco menor**); esta disparidad resulta de la geometría de los pares de bases. Los enlaces glucosídicos entre las bases y la pentosa de la cadena no están dispuestos directamente uno enfrente del otro, sino que están desplazados hacia el surco estrecho. Es de destacar que se puede determinar la secuencia del DNA sin disociar la doble hélice, inspeccionando el interior de los surcos. Puesto que cada una de las cuatro bases tiene su propia orientación en relación con el resto de la hélice, cada una de las bases expone siempre los mismos átomos en los surcos. Estos átomos, por lo tanto, constituyen la base del reconocimiento específico del DNA por otras moléculas como las proteínas. Por ejemplo, el N-7 de las purinas siempre se encuentra en el surco mayor y puede servir de aceptor de puentes de hidrógeno en la interacción con grupos dadores de las proteínas (Figura 2.16). De la misma forma, el grupo 2-NH_2 exocíclico de la guanina siempre se proyecta en el surco menor y puede bloquear estéricamente la unión de moléculas pequeñas.

Factores que estabilizan la doble hélice del DNA

Los mismos factores que estabilizan las hélices de los polinucleótidos de cadena sencilla, es decir, las interacciones de apilamiento, también actúan en la estabilización de la doble hélice. La separación entre el núcleo hidrofóbico de las bases apiladas y el exterior hidrofílico de los grupos cargados azúcar-fosfato es incluso más pronunciada en la doble hélice que en las hélices de cadena sencilla. La tendencia al apilamiento de los polinucleótidos de cadena sencilla puede considerarse como una consecuencia de la tendencia de las bases a reducir el contacto con el agua. La hélice de doble hebra es un ordenamiento muy favorable, ya que permite que los fosfatos hidrofílicos del esqueleto estén altamente solvatados por el agua, mientras que las bases se encuentran prácticamente separadas del entorno acuoso.

Se estima que las **interacciones de apilamiento**, una combinación de interacciones de van der Waals y fuerzas hidrofóbicas, generan unas 4-15 kcal mol^{-1} de energia de estabilisación por cada par de bases adyacentes apiladas (Tabla 2.1). La extensa red de puentes de hidrógeno cooperativos genera una estabilización adicional de la doble hélice. Los puentes de hidrógeno típicos son relativamente débiles (3–7 kcal mol^{-1}) y más débiles todavía en el DNA (2–3 kcal mol^{-1}) debido a las restricciones geométricas que impone la doble hélice. No obstante, los puentes de hidrógeno proporcionan una parte sustancial de la energía de estabilización de la doble hélice por efecto acumulativo. Sin embargo, dado que los puentes de hidrógeno en los pares de bases meramente reemplazan a los que se establecen entre las bases y el agua en los polinucleótidos de cadena sencilla, no contribuyen a la estabilización selectiva de la doble hélice en relación con los polinucleótidos de cadena sencilla. No obstante, a diferencia de las fuerzas de apilamiento, los puentes de hidrógeno son altamente direccionales, y son capaces de discriminar entre los pares de bases correctos y los incorrectos. Gracias a su direccionalidad, los puentes de hidrógeno tienden a orientar las bases de tal manera que favorecen su apilamiento. Por lo tanto, la contribución de los puentes de hidrógeno es, indirectamente, esencial para la estabilidad de la doble hélice.

La importancia relativa de las interacciones de apilamiento respecto a los puentes de hidrógeno en la estabilización de la doble hélice no siempre fue reconocida en su justa medida. De hecho, los puentes de hidrógeno fueron considerados como el "adhesivo" que mantiene juntas las dos hebras. Sin embargo, experimentos con reactivos que reducen la estabilidad de la doble hélice (**desnaturalizantes**) ponen de manifiesto la mayor importancia relativa de las interacciones de apilamiento (Tabla 2.2). Estos resultados muestran que el efecto desestabilizador de un reactivo no está relacionado con su capacidad para romper puentes de hidrógeno, sino por la solubilidad de las bases libres en el reactivo. En los mejores disolventes de las bases la tendencia al apilamiento disminuye y la doble hélice pierde estabilidad.

Las fuerzas iónicas también afectan a la estabilidad y a la conformación de la doble hélice. A pH fisiológico, los grupos fosfodiéster están completamente ionizados; por lo tanto, hay dos cargas negativas por par de bases en el exterior de la doble hélice. La repulsión electrostática entre los grupos fosfato cargados negativamente es desestabilizante y tiende a separar las hebras complementarias. En agua destilada, las

TABLA 2.1 Energías de apilamiento de los pares de bases.

Pares de bases de los dinucleótidos	*Energías de apilamiento (kcal mol^{-1} por par de bases apiladas)*[a]
(GC) · (GC)	− 14,59
(AC) · (GT)	− 10,51
(TC) · (GA)	− 9,81
(CG) · (CG)	− 9,69
(GG) · (CC)	− 8,26
(AT) · (AT)	− 6,57
(TG) · (CA)	− 6,57
(AG) · (CT)	− 6,78
(AA) · (TT)	− 5,37
(TA) · (TA)	− 3,82

[a] Datos de Ornstein, R. L., Reim. R., Breen, D. L. y Mc Elroy, R. D. *Biopolymers* 17:2341, 1978.

TABLA 2.2 Efectos de diversos reactivos sobre la estabilidad de la doble hélice.[a]

Reactivo	*Solubilidad de la adenina $\times 10^{-3}$ (en reactivo 1 M)*	*Molaridad que produce 50% de desnaturalización*
Etilurea	22,5	0,60
Propionamida	22,5	0,62
Etanol	17,7	1,2
Urea	17,7	1,0
Metanol	15,9	3,5
Formamida	15,4	1,9

Fuente: Datos de Levine, L., Gordon, J. y Jencks, W. P. *Biochemistry* 25168, 1963.

[a] El efecto desestabilizador de estos reactivos sobre la doble hélice es independiente de su capacidad para romper puentes de hidrógeno. El efecto desestabilizador está determinado más bien por la solubilidad de la adenina. Se esperarían resultados parecidos si se examinase la solubilidad de las otras bases.

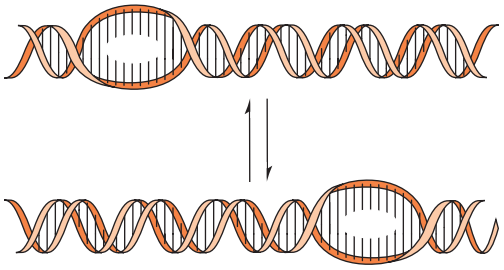


FIGURA 2.18
Migración de burbujas a lo largo de la doble hélice del DNA.
El DNA contiene cortas secciones con las hebras abiertas que se pueden "mover" a lo largo de la hélice.

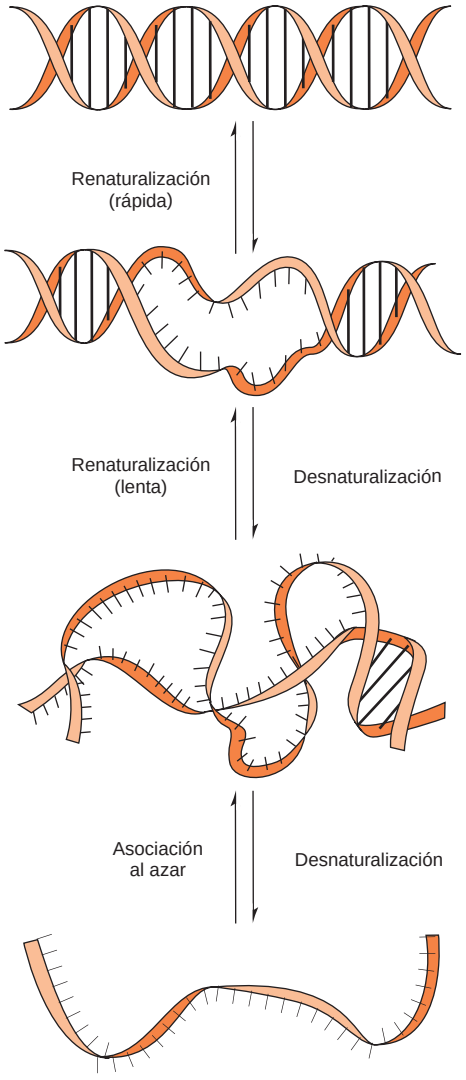


FIGURA 2.19
Desnaturalización del DNA.
A temperaturas elevadas la estructura en doble cadena del DNA está totalmente desorganizada; finalmente las cadenas se separan y se forman ovillos abiertos monohebra. La desnaturalización también tiene lugar a pH o a fuerzas iónicas extremos.

hebras de DNA se separan a temperatura ambiente. Sin embargo, los cationes como el Mg^{2+}, la espermina^{4+} (una tetraamina) y las cadenas laterales básicas de las proteínas apantallan los grupos fosfato y disminuyen las fuerzas repulsivas.

Desnaturalización y renaturalización

Las hebras de la doble hélice se separan durante casi todos los procesos biológicos importantes en que participa el DNA, como son la replicación, la transcripción, la reparación y la recombinación. Las fuerzas que mantienen juntas las dos cadenas son suficientes para mantener la estabilidad, pero suficientemente débiles para permitir la fácil separación de las hebras. La doble hélice está estabilizada en relación con las cadenas sencillas por aproximadamente 1 kcal por par de bases, de forma que una perturbación relativamente pequeña puede producir la desorganización local de la doble hélice, siempre que se trate de un fragmento corto de DNA. Cuando estos pares de bases se vuelven a formar liberan energía libre que puede producir el desenrollamiento de los pares de bases adyacentes. De esta manera, pequeñas interrupciones de la doble hélice pueden migrar por toda su longitud (Figura 2.18). Así pues, en un instante dado, la mayor parte de las bases permanecen unidas por puentes de hidrógeno, si bien todas las bases pueden pasar a través del estado monocatenario durante un corto período de tiempo. La capacidad de "respirar" de la doble hélice del DNA es un requisito esencial de sus funciones biológicas.

La separación de las cadenas de DNA en disolución puede ser estudiada aumentando la temperatura. A temperaturas relativamente bajas, se desaparean unos cuantos pares de bases, formando una o varias "**burbujas**" (Figura 2.19). Estas burbujas se forman inicialmente en regiones que contienen proporciones relativamente elevadas de pares adenina-timina, debido a las menores energías de apilamiento de estos pares de bases. A medida que sube la temperatura, el tamaño de las burbujas aumenta hasta que, finalmente, el movimiento térmico del polinucleótido supera a las fuerzas que estabilizan la doble hélice. A temperaturas aún más elevadas, las hebras se separan físicamente y adquieren una conformación en ovillo estadístico. Este proceso se designa con mayor precisión como transición hélice-ovillo, pero comúnmente se denomina desnaturalización o fusión.

La **desnaturalización** viene acompañada por varios cambios físicos, entre los cuales se encuentran un aumento de la densidad de flotación, una reducción de la viscosidad, un cambio en la capacidad de girar la luz polarizada y cambios en la absorción de la luz UV. Los cambios de absorción de luz UV se usan con frecuencia para seguir experimentalmente el proceso de desnaturalización (Figura 2.20). Debido a la fuerte absorbancia de las bases púricas y pirimidínicas, el DNA absorbe intensamente en la región de UV con un máximo próximo a los 260 nm. Sin embargo, la absorbancia de las bases individuales se reduce a causa de las interacciones electrónicas que resultan del apilamiento. La absorbancia total de las bases apiladas puede ser hasta un 40% menor que en el estado desapilado. Esta reducción del coeficiente de extinción de las bases agregadas se denomina **hipocromicidad**. A medida que se destruye la estructura ordenada de la doble hélice con el aumento de la temperatura, las interacciones de apilamiento disminuyen gradualmente. Por tanto, la absorbancia de un polinucleótido totalmente desordenado no es muy diferente de la suma de las absorbancias de sus constituyentes purínicos y pirimidínicos.

La medida de la absorbancia a 260 nm mientras aumenta lentamente la temperatura permite observar la desnaturalización del DNA. En un experimento de desnaturalización térmica, seguido por espectroscopia de absorción, la absorbancia del polinucleótido normalmente cambia muy lentamente al principio, para, a continuación, aumentar rápidamente hasta un valor máximo (Figura 2.20). Antes de la subida, el DNA es de doble cadena. En la zona de subida de la curva se disocia un

número creciente de pares de bases. La separación de las hebras tiene lugar a una temperatura crítica correspondiente a la meseta superior de la curva. Sin embargo, si la temperatura desciende antes de producirse la completa separación de las dos hebras, se recupera completamente la estructura nativa. La temperatura del punto de inflexión de la transición, la T_m, es característica de la composición en bases de cada DNA, en condiciones estándar de concentración y fuerza iónica. Cuanto más elevado sea el contenido de guanina–citosina, más elevada será la temperatura de transición entre la hélice de doble hebra y las hebras sencillas. Esta diferencia en los valores de T_m se atribuye a la mayor estabilidad de los pares guanina–citosina, debido a que las interacciones de apilamiento son más favorables.

El DNA también puede desnaturalizarse a valores de pH superiores a 11,3, pues la desprotonación de los grupos N—H impide su participación en enlaces de hidrógeno. A menudo se prefiere la desnaturalización alcalina en lugar de la desnaturalización térmica para evitar la rotura de enlaces fosfodiéster que puede producirse a elevadas temperaturas o a pH bajo. También puede inducirse desnaturalización a bajas fuerzas iónicas, a causa del aumento de la repulsión entre los fosfatos cargados negativamente de las dos hebras, y por la acción de diversos compuestos desnaturalizantes, (compuestos que pueden formar eficazmente enlaces de hidrógeno con las bases y a la vez impedir las interacciones de apilamiento hidrofóbicas). Puede obtenerse una curva de desnaturalización completa, similar a la que se muestra en la Figura 2.20, a temperatura constante relativamente baja aumentando la concentración de un desnaturalizante tal como la urea.

Las hebras complementarias de DNA, separadas por desnaturalización pueden reformar una doble hélice si se tratan adecuadamente, según un proceso conocido como **renaturalización** o **reasociación por complementariedad** ("**reannealing**"). Si la desnaturalización no es completa, es decir, si permanecen algunas bases formando puentes de hidrógeno entre las dos hebras, la transición de hélice a ovillo puede revertir rápidamente. La renaturalización es posible incluso después de la separación completa de las dos hebras complemenarias. En estas condiciones el proceso de renaturalización depende de la coincidencia exacta entre las hebras complementarias del DNA de modo que se pueda volver a formar la estructura original. No es sorprendente, pues, que sea un proceso lento y dependiente de la concentración. Al principio de la renaturalización, algunos enlaces de hidrógeno se forman entre secuencias cortas de nucleótidos que pueden estar muy separadas en la estructura nativa original. Estas secuencias renaturalizadas al azar tienen una corta vida media, pues las bases que rodean estos cortos fragmentos complementarios no pueden aparearse para formar una estructura estable perfectamente apareada. Una vez que se produce el apareamiento al azar de las bases correctas, la doble hélice se vuelve a formar rápidamente a lo largo de toda la molécula de DNA.

El inicio brusco de la desnaturalización/renaturalización pone de manifiesto el carácter de "todo o nada" de la transición hélice-ovillo. El proceso de renaturalización descrito requiere la formación de regiones cortas de doble hélice para iniciar la formación de la doble hélice (Figura 2.21). El proceso comienza con la formación de un único par de bases, que es muy inestable. Sin embargo, la formación de un segundo par de bases es mucho más favorable porque ahora el componente entrópico es mucho menos desfavorable. A medida que nuevos pares de bases empiezan a formar una estructura apilada, la formación de pares de bases adicionales es todavía más favorable. Los nucleótidos no apareados de cada cadena empiezan a

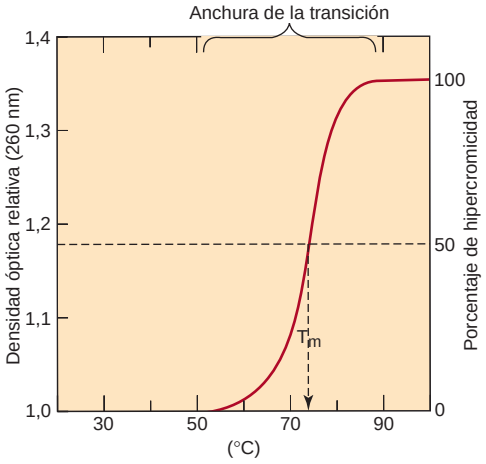


FIGURA 2.20
Perfil de temperatura–densidad óptica del DNA.
Cuando se calienta el DNA, la absorbancia a 260 nm aumenta con la temperatura. La gráfica en la que se representa la absorbancia frente a la temperatura se denomina "curva de fusión". La densidad óptica relativa es la proporción entre la densidad óptica a la temperatura indicada respecto a la de baja temperatura. La temperatura a la que se obtiene la mitad de la densidad óptica máxima es la temperatura de fusión (T_m).

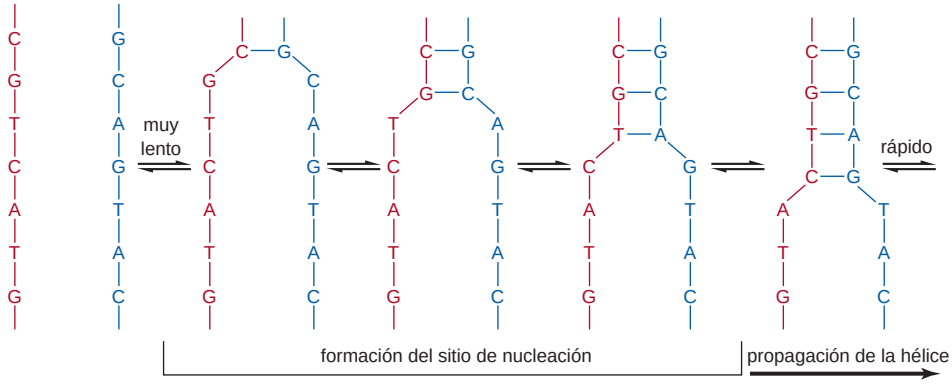


FIGURA 2.21
Cooperatividad de la renaturalización/desnaturalización de las doble hélices del DNA.
Durante la renaturalización, la formación del primer par de bases es muy lenta. El apareamiento de los nucleótidos vecinos está facilitada por la formación de un "sitio de nucleación" de 3–5 pb. La desnaturalización sigue una ruta similar, pero el orden de las etapas es inverso.
Adaptado de Saenger, W. Principles of Nucleic Acid Structure. *New York: Springer-Verlag, 1984, p. 141.*

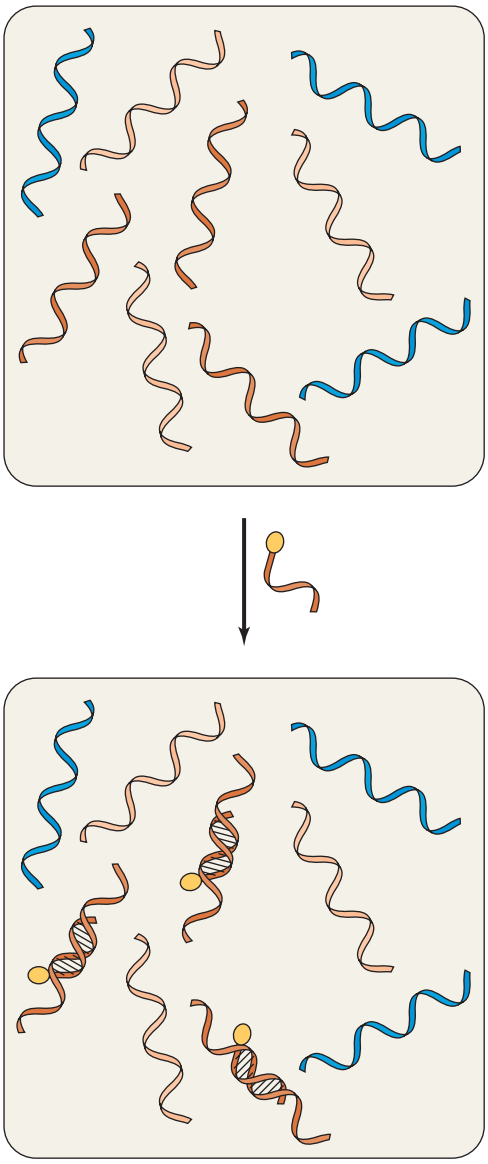


FIGURA 2.22
Esquema general de los experimentos de hibridación.
Una mezcla de DNA desnaturalizados se hibrida con una sonda marcada. La sonda puede hibridar con los DNA que contengan secuencias complementarias. La detección de los complejos de doble cadena permite la detección y la cuantificación del DNA que contiene la secuencia buscada. Las aplicaciones específicas a menudo incorporan pasos para separar e inmovilizar los diferentes DNA de la mezcla.

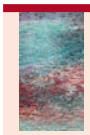
apilarse sobre la hélice en crecimiento si están posicionados adecuadamente para el apareamiento. Después de la formación de una doble hélice de cuatro o cinco pares de bases se forma una doble hélice estable y el resto de la estructura se forma rápidamente. Después de la formación del primer par de bases, el apilamiento y el apareamiento dejan de ser acontecimientos independientes y están influidos por los pares de bases vecinos. Un proceso de estas características se denomina **cooperativo**. Las doble hélices cortas sirven de sitios de nucleación para la renaturalización, que facilitan la formación de sucesivos pares de bases. La desnaturalización es el proceso inverso: una burbuja sirve de sitio de iniciación para el desapilamiento de las bases y la rápida desnaturalización de la hélice.

Hibridación

La autoasociación de hebras polinucleotídicas complementarias ha proporcionado la base para el desarrollo de la técnica de **hibridación**. Esta técnica consiste en la asociación entre dos cadenas polinucleotídicas, que pueden tener el mismo o diferente origen y longitud, siempre que exista complementariedad entre las cadenas. La hibridación puede tener lugar no sólo entre cadenas de DNA, sino también entre cadenas de RNA complementarias y combinaciones de DNA–RNA. Se han desarrollado técnicas para detectar y medir la cantidad de polinucleótido hibridado y para medir las velocidades de hibridación. Estas técnicas forman parte de los métodos básicos de la biología molecular contemporánea y se utilizan para: (1) determinar si una cierta secuencia de DNA está representada más de una vez en un organismo particular; (2) demostrar la existencia de relación genética o evolutiva entre organismos diferentes; (3) determinar el número de genes transcritos en un mRNA particular; y (4) determinar la localización de una secuencia de DNA determinada por hibridación con un polinucleótido complementario, denominado **sonda**, marcado convenientemente para la fácil detección del híbrido. En un experimento típico, el DNA se desnaturaliza y se inmoviliza mediante fijación a una matriz insoluble adecuada. Luego se permite que las **sondas de DNA** marcadas hibriden con las secuencias complementarias unidas a la matriz (Figura 2.22). Las sondas consisten en cortos oligonucleótidos de DNA o RNA que son complementarios de secuencias específicas de interés presentes en el DNA genómico. En condiciones adecuadas, las sondas interaccionan solamente con las secuencias buscadas, revelando así su presencia en una muestra concreta de DNA. Las sondas tienen generalmente al menos 15-20 nucleótidos. Para el marcaje de las sondas se dispone de elementos radiactivos, cromóforos fluorescentes y biotina. Puesto que el complejo en doble hélice que contiene la sonda hibridada se encuentra normalmente unido a una matriz insoluble, la sonda sobrante que no ha hibridado puede lavarse fácilmente. La detección de los marcadores unidos permite la cuantificación directa de la secuencia buscada. La medida de la cantidad máxima de DNA que puede hibridar permite establecer homologías entre DNA de diferentes especies, porque las secuencias de bases del DNA de cada organismo son únicas. De acuerdo con este criterio, la reasociación puede utilizarse para determinar en qué medida los DNA aislados de especies diferentes están relacionados. Las homologías observadas sirven de índice del parentesco evolutivo y han sido especialmente útiles en la elaboración de filogenias en los procariotas. Los estudios de hibridación entre DNA y RNA han proporcionado, además, información muy útil sobre el papel biológico del DNA, especialmente sobre el mecanismo de transcripción. Las baterías de sondas son útiles para el diagnóstico rápido y seguro de enfermedades genéticas e infecciosas y del cáncer, tal como se describe brevemente en la Apli. Clín. 2.2.

Conformaciones del DNA de cadena doble

Los primeros estudios de difracción de rayos X ya mostraron que había más de una conformación para el DNA (Figura 2.23). Una de ellas, el **DNA A**, se encontró en condiciones de baja humedad relativa y elevada concentración salina. La adición de los disolventes orgánicos, como el etanol, reduce la "humedad" de estas disoluciones acuosas. Una forma diferente, el **DNA B**, se encontró en condiciones de alta humedad y baja concentración salina y fue la base de la estructura de Watson y Crick. Se han descrito once conformaciones diferentes para el DNA de doble hélice. Estas conformaciones varían en la orientación de las bases en la hélice y entre sí, así como en otros parámetros geométricos de la doble hélice. Una de estas formas, el **DNA Z**, consiste en una hélice levógira, en lugar de la habitual hélice dextrógira.

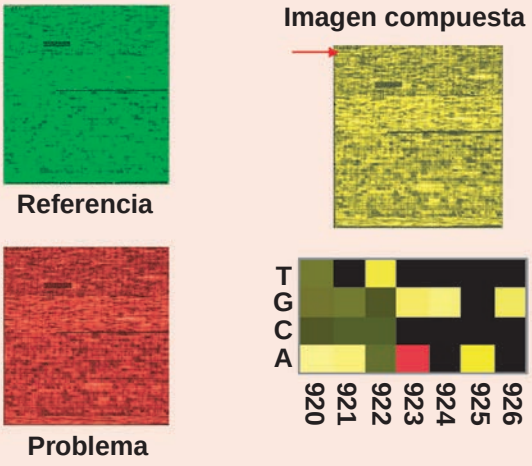


APLICACIÓN CLÍNICA 2.2
Uso diagnóstico de los chips de DNA en medicina y genética

Con el proyecto Genoma Humano ya finalizado, está disponible una gran cantidad de información genética. La aplicación de estos conocimientos a la medicina requiere el desarrollo de nuevas técnicas para evaluar la expresión génica y el análisis de la presencia de mutaciones y otros cambios de la secuencia de los genes. Los chips de oligonucleótidos son muy prometedores para estas aplicaciones. Estos chips consisten en una serie de sondas específicas de gen inmovilizadas en sitios definidos de una matriz sólida (chip). Los chips contienen millares de moléculas distintas, cada una en una "localización" concreta. Los chips génicos pueden ser tratados con ácidos nucleicos diana marcados (DNA o RNA) procedentes de las células de un organismo. La hibridación de las dianas con las secuencias complementarias de las sondas inmoviliza el marcaje en sitios específicos del chip. De esta forma es posible detectar la presencia de secuencias específicas y se puede cuantificar la cantidad de diana marcada en un sitio específico, que está relacionada con la cantidad de cada diana en la muestra.

Los microchips de DNA permiten la detección de mutaciones en células humanas. Por ejemplo, los microchips de alta densidad de DNA se han utilizado para el escrutinio de mutaciones implicadas en la ataxia telangiectasia, una enfermedad genética recesiva caracterizada por desórdenes neurológicos, infecciones respiratorias recurrentes y dilatación de los vasos sanguíneos de la piel y los ojos. Se han realizado estudios similares para detectar mutaciones en el gen BRCA1, relacionado con el cáncer herditario de mama y ovarios, y de otros marcadores genéticos de enfermedades. En el futuro, estas técnicas pueden ser útiles para el diagnóstico, gracias a sus posibilidades para el rápido examen de la presencia de mutaciones asociadas a enfermedades en el DNA genómico.

Freeman, W. M., Robertson, D. J. y Vrana, K. E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques* 29:1042, 2000; y Hacia, J. G., Brody, L. C., Chee, M. S., Fodor, S. P. y Collins, F. S. Detection of heterozygous mutations in *BRCA1* using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat. Genet.* 14:441, 1996.



Microchips de DNA de alta densidad para el análisis de mutaciones.
Los microchips para la ataxia telangiectasia (A-T) se usan separadamente con una muestra de referencia (sin mutuación) y con la muestra investigada. La combinación de las imágenes de los dos experimentos genera una imagen compuesta. En los sitios donde la referencia y el problema tienen la misma secuencia, la imagen compuesta es amarilla (rojo + verde). En esta muestra, la persona tiene una mutación en la posición 923, que aparece en rojo. Esta mutación, la sustitución de una G por una A, causa la terminación prematura de la síntesis de la proteína. Esta muestra también presenta una mancha amarilla en la posición 923, por tanto la mutación ha ocurrido en una sola copia del gen (es un heterocigoto). En los desórdenes recesivos, tales como la A–T, los heterocigotos son portadores, pero ellos no desarrollan la enfermedad.

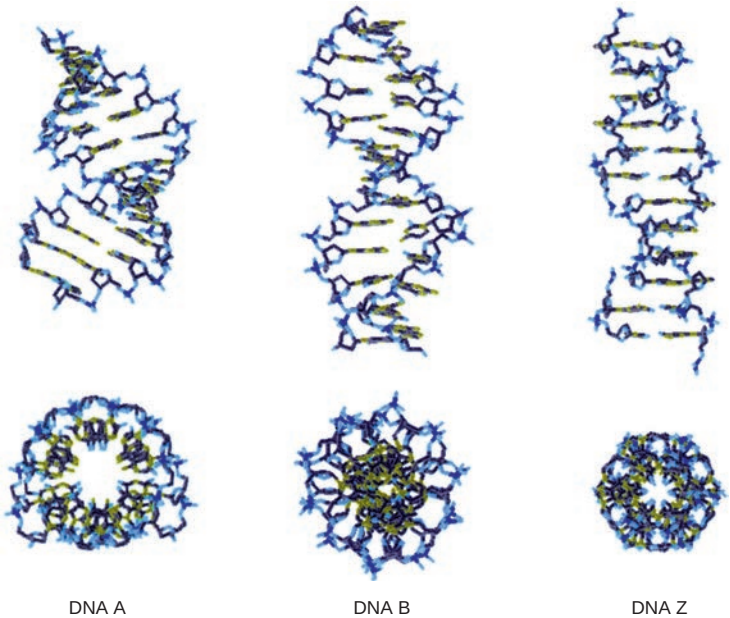


FIGURA 2.23
Las diversas geometrías de la doble hélice del DNA.
Según las condiciones y la secuencia de bases, la doble hélice puede adquirir distintas formas geométricas. Hay tres familias principales de conformaciones del DNA: A, B y Z. Las formas dextrógiras, DNA A y DNA B, difieren en el ahuecamiento del azúcar, que da lugar a diferentes estructuras helicoidales. La forma A está subenrollada, comparada con la forma B, y la hélice resultante es más corta y gruesa. La estructura de la forma Z es levógira y con el esqueleto en zigzag. El ahuecamiento del azúcar y las conformaciones de los enlaces glucosídicos se van alternando en los sucesivos residuos, lo que produce la inversión de la dirección de la cadena.

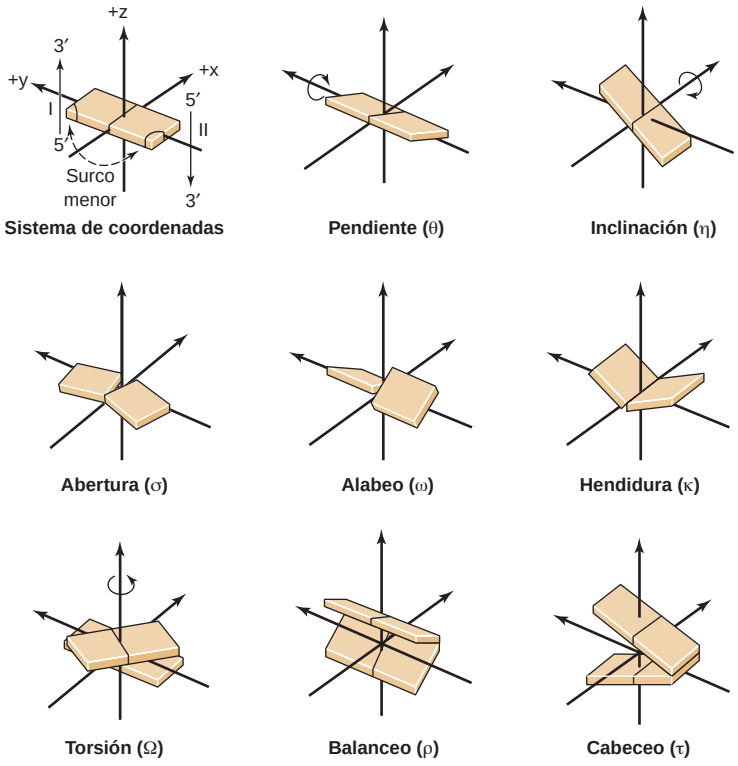


FIGURA 2.24
Parámetros utilizados para describir la orientación de un par de bases en la doble hélice.
Las perturbaciones del par de bases ideal de Watson y Crick incluyen el movimiento de una base individual con relación a la otra (fila de en medio) o el movimiento coordinado del par de bases entero en relación con el sistema de coordenadas (fila superior) o al par de bases vecino (fila inferior)
Adaptado de Hecht, S.M. (Ed.). Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids. *New York, Oxford University Press, 1996, p. 109.*

El **polimorfismo estructural** del DNA de doble hebra depende de la composición en bases y de las condiciones físicas. La estructura local del DNA es suficientemente flexible para permitir cambios de conformación que maximicen el apilamiento y a la vez minimicen las interacciones estéricas desfavorables. La variedad de formas y propiedades electrónicas de las bases provoca cambios de apilamiento dependientes de secuencia. Los cálculos de energía de apilamiento de varias parejas de bases apiladas muestran estas diferencias. El solapamiento de las bases cambia según la secuencia y la conformación. Las preferencias de apilamiento de las bases pueden favorecer determinadas conformaciones. Por esta razón, las guaninas consecutivas en una de las cadenas favorecen las conformaciones de tipo A. Las interacciones estéricas repulsivas entre dos bases o entre las bases y los azúcares de la cadena principal también pueden producir cambios en la geometría de los pares de bases que originen cambios de conformación. Las diferentes orientaciones entre los planos de las bases unidas por puentes de hidrógeno pueden producir variantes de la doble hélice con diferente pendiente, balanceo, torsión o alabeo (Figura 2.24).

Las condiciones de disolución también juegan un papel central en la determinación de la conformación más favorable. Las moléculas de agua interaccionan de forma diferente con las dobles hélices de diferente conformación. Por ejemplo, los grupos fosfato del DNA B son más accesibles a las moléculas de agua que en el

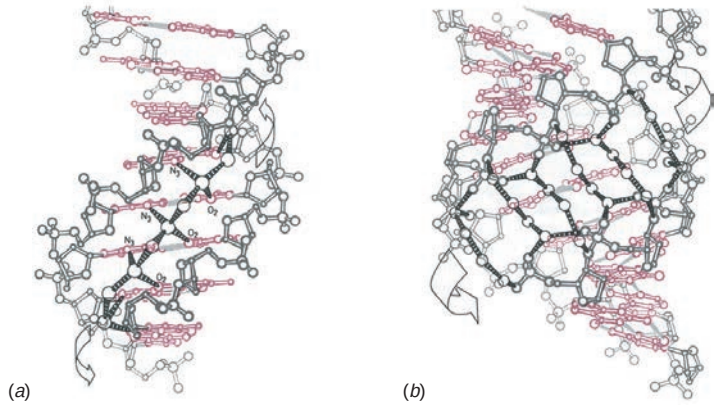


FIGURA 2.25
Hidratación de los surcos del DNA.
(*a*) El surco menor del DNA B está ocupado por una espina de hidratación.
(*b*) Los fosfatos que recubren el surco mayor están entrecruzados por una red de moléculas de agua en el DNA A.
Reproducido con autorización de Saenger, W. Principles of Nucleic Acid Structure. *New York: Springer-Verlag, 1984, p. 379.*

DNA A. Los grupos polares de las bases también están más hidratados en el DNA en conformación B. De hecho, en la secuencias ricas en AT se forma una estructura de moléculas de agua, la espina de hidratación, que ocupa el surco menor del DNA B (Figura 2.25*a*). Cuando disminuye la "humedad", las moléculas de agua solvatan los grupos fosfato altamente polares con preferencia a las bases. El surco mayor se estrecha, permitiendo que las moléculas de agua entrecrucen los fosfatos (Figura 2.25*b*). Esta red de moléculas de agua estabiliza la conformación del DNA A. Las diferentes conformaciones del DNA pueden agruparse en tres familias: DNA A, DNA B y DNA Z. Los parámetros de estas conformaciones, listados en la Tabla 2.3, se determinaron por difracción de rayos X. Estos métodos dan información muy precisa sobre la geometría molecular y las dimensiones de muestras cristalinas, pero sólo suministran las dimensiones aproximadas de las macromoléculas en disolución. Hay que destacar que se admite que la conformación predominante del DNA *in vivo* es la B. Esta conformación, a diferencia de las formas A y Z, es muy flexible. En el DNA B nativo puede haber notables variaciones locales en la conformación de los nucleótidos individuales. Estos cambios pueden ser importantes en la regulación de la expresión génica, pues pueden influir en la unión al DNA de varios tipos de proteínas reguladoras.

Las conformaciones del DNA de la familia B tienen los pares de bases aproximadamente perpendiculares al eje de la hélice, que pasa a través de los pares de bases. Los surcos mayor y menor tienen aproximadamente la misma profundidad; el surco menor es relativamente estrecho. Los ahuecamientos son generalmente C-2′ *endo* y las base ocupan la conformación *anti* del enlace glucosídico. La hélice es relativamente larga y delgada, con aproximadamente 10 pares de bases por vuelta helicoidal. El desplazamiento por residuo es de 3,4 Å, que es aproximadamente igual al espesor de las bases.

En cambio, la estructura del DNA A es más corta y gruesa. Tiene unos 11 pares de bases por vuelta helicoidal con un desplazamiento de 2,56 Å por residuo. Para acomodar el espesor de las bases, el par de bases está inclinado 20º con respecto al plano perpendicular al eje helicoidal. El eje helicoidal está desplazado hacia el lado del surco mayor de los pares de bases, con el resultado de un surco mayor muy profundo y un surco menor superficial. El desplazamiento del eje también forma un agujero de unos 3 Å de diámetro a lo largo del centro de la hélice. Mientras que la conformación del enlace glucosídico permanece *anti* para todas las bases, el ahuecamiento del azúcar cambia a C-3′ *endo*. El cambio de ahuecamiento aproxima los fosfatos en el DNA A, en comparación con la conformación B (5,9 Å frente a 7,0 Å). La humedad baja favorece la estructura del DNA A, que expone más superficie hidrofóbica al disolvente que el DNA B.

La forma Z es una forma radicalmente diferente del DNA de doble hélice. Su característica más sobresaliente es que forma una doble hélice levógira. Se observa generalmente en secuencias de purinas y pirimidinas alternantes, especialmente $d(GC)_n$. La denominación "Z" se eligió porque el armazón fosfodiéster adopta una

TABLA 2.3 Características estructurales del DNA A, B y Z.

Características	*DNA A*	*DNA B*	*DNA Z*
Rotación de la hélice	Dextrógira	Dextrógira	Levógira
Pares de bases por vuelta (cristal)	10,7	9,7	12
Pares de bases por vuelta (fibra)	11	10	—
Pares de bases por vuelta (solución)	—	10,5	—
Paso de rosca de una vuelta helicoidal	24,6 Å	33,2 Å	45,6 Å
Proporciones	Corta y ancha	Más larga y delgada	Alargada y delgada
Diámetro de empaquetamiento de la hélice	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
Desplazamiento por par de bases (cristal)	2,3 Å	3,3 Å	3,7
Desplazamiento por par de bases (fibra)	2,6	3,4 Å	—
Inclinación del par de bases	+19°	−1,2° (pero varía)	−9°
Alabeo	+18°	+16°	0°
Rotación del eje de la hélice	Surco mayor	A través de los pares de bases	Surco menor
Conformación del anillo de azúcar (cristal)	C-3′ *endo*	Variable	Alterno
Conformación del anillo de azúcar (fibra)	C-3′ *endo*	C-2′ *endo*	—
Conformación del enlace glucosídico	anti	anti	*anti* en C, *syn* en G

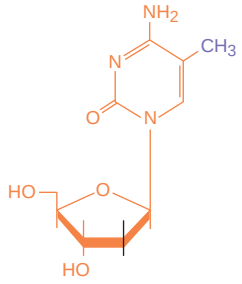


FIGURA 2.26
Estructura de la 5-metildesoxicitidina.

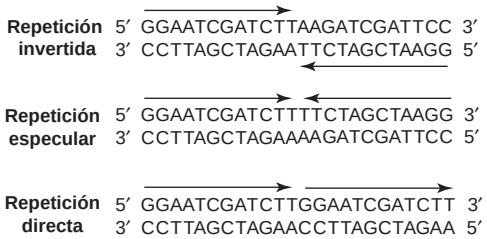


FIGURA 2.27
Elementos de simetría de las secuencias de DNA.
Se muestran tres tipos de elementos de simetría de las secuencias de DNA de doble cadena. Las flechas ilustran las relaciones especiales de estos elementos en cada una de estas secuencias. En las repeticiones invertidas, también denominadas palíndromos, cada cadena es autocomplementaria en la región invertida que contiene los elementos de simetría. Una repetición especular se caracteriza por la presencia de los mismos pares de bases equidistantes de un centro de simetría dentro del segmento de DNA. Las repeticiones directas son regiones del DNA en las cuales se repite una secuencia determinada. Las repeticiones no tienen que ser necesariamente adyacentes.

disposición en "zigzag", a diferencia de la conformación uniforme que caracteriza a otras formas en doble hebra. El zigzag procede de la conformación *syn* de las purinas, mientras que las pirimidinas conservan la conformación *anti*. Las conformaciones alternantes originan el cambio de la dirección de la cadena. La estructura del DNA Z es más larga y mucho más delgada que la del DNA B, y completa una vuelta cada 12 pares de bases. El surco menor es muy profundo y contiene el eje helicoidal. Los pares de bases están tan desplazados hacia la superficie del surco mayor que deja de existir un canal distinto. Por lo tanto, la conformación del DNA Z puede contemplarse como el resultado de la "eclosión" del surco mayor del DNA B para formar la superficie externa del DNA Z. Este cambio dispone las bases apiladas en el exterior del DNA Z, al contrario de sus posiciones convencionales en el interior de la doble hélice.

La función biológica del DNA Z se desconoce. Algunos resultados sugieren que el DNA Z influye en la expresión y regulación génica. Los pequeños fragmentos de DNA con potencial para formar DNA Z se encuentran con mayor frecuencia en el extremo 5′ de los genes, región que regula la actividad transcripcional. Estos fragmentos consisten en purinas y pirimidinas alternantes que favorecen la conformación Z. Otro argumento en favor de la implicación del DNA Z en la regulación génica es la estabilización de la forma Z por la metilación de los residuos de guanina en C-8 o N-7 o de las citosinas en C-5. Las secuencias que no son estrictamente de purinas y pirimidinas alternantes también pueden adquirir la conformación Z como consecuencia de la metilación. Por ejemplo, el hexanucleótido m5CGATm5CG (m5C es 5-metildesoxicitidina, Figura 2.26) forma DNA Z. Según esto podría esperarse que *in vivo* la metilación de las citosinas también indujera la transición B → Z en el DNA celular. La posibilidad de que el DNA Z pueda tener un papel en la regulación génica está apoyada por los cambios en los patrones de metilación que acompañan a los procesos de expresión génica. Sin embargo, el DNA Z todavía no ha sido detectado *in vivo*.

Estructuras no canónicas del DNA

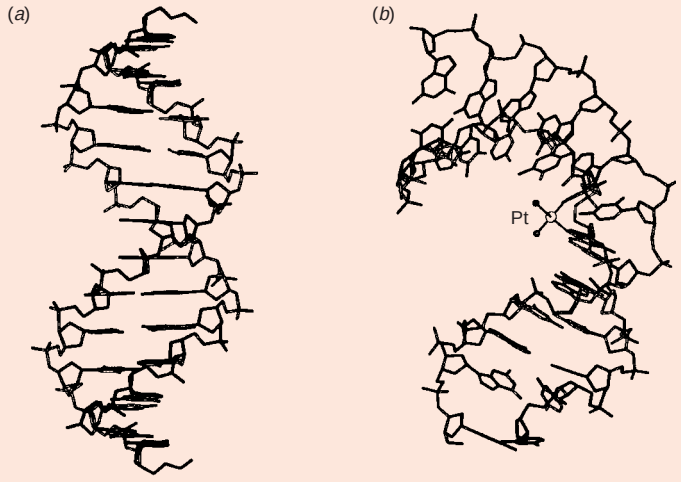
Las variantes conformacionales del DNA, es decir, las formas A, B y Z, están asociadas principalmente con variaciones en la conformación de los nucleótidos. Actualmente se admite que el DNA no es una estructura recta, monótona y uniforme. El DNA forma estructuras poco usuales, tales como cruciformes, conformaciones en cadena triple y codos, cuando interacciona con ciertas proteínas. Estas variantes conformacionales son, al parecer, señales habituales en el reconocimiento molecular del DNA por proteínas y enzimas. Las variaciones en la estructura o la conformación están favorecidas por la presencia de motivos específicos en la secuencia del DNA. Estos motivos incluyen secuencias de DNA con elementos de simetría, tales como repeticiones invertidas, palíndromos, repeticiones especulares y repeticiones directas (Figura 2.27), así como secuencias de homopurina–homopirimidina, secuencias de A en fase y regiones ricas en G. Las secuencias ricas en AT, cuyas hebras se separan con facilidad, se encuentran cerca de los orígenes de replicación. El genoma humano es rico en secuencias de homopurina–homopirimidina y en fragmentos de purina–pirimidina alternantes. En esta sección comentaremos, entre otras, algunas estructuras del DNA, tales como el DNA curvado, el DNA mal apareado por deslizamiento de las hebras, la formación de cruciformes y las conformaciones en triple y cuádruple hebra.

DNA curvado

Las secuencias de DNA con segmentos de 4 a 6 adeninas separados a intervalos regulares de 10 pares bases producen conformaciones curvadas. Es de destacar que los resultados de espectroscopia de RMN indican que los segmentos de A son especialmente rígidos y rectos. El DNA de secuencia mixta tiende a curvarse, pero la curvas en diferentes direcciones tienden a anularse al considerar largos fragmentos de DNA. Sin embargo, si los segmentos rectos de A están dispuestos en fase con la periodicidad del DNA, aparece una curva estable. Algunos modelos a tener en cuenta suponen que la conformación curvada resulta del colapso del surco menor del segmento de A o, alternativamente, de una estructura peculiar de la articulación del segmento de A con la secuencia flanqueante. La curvatura del DNA es, al parecer, un elemento fundamental en la interacción del DNA con proteínas

APLICACIÓN CLÍNICA 2.3
Antibióticos antitumorales que cambian la forma del DNA

La estructura tridimensional local del DNA es importante en las interacciones con proteínas implicadas en la reparación, transcripción, recombinación y condensación de la cromatina. Recientemente se ha propuesto que algunos antibióticos pueden inducir estructuras en el DNA capaces de reclutar estas proteínas, provocando efectos citotóxicos. El ejemplo mejor estudiado es el compuesto antitumoral cisplatino, un complejo de platino tetracoordinado [*cis*-$Pt(NH_2)_2Cl_2$]. El cisplatino se usa solo o combinado con otros agentes antitumorales para tratar una amplia variedad de tumores, que incluyen los cánceres de testículo, ovarios, huesos y pulmón. Este complejo de platino forma entrecruzamientos inter- e intracatenarios en el DNA de doble cadena, de los cuales estos últimos representan el 90%. Estos enlaces resultan del desplazamiento de los ligandos de cloruro sobre el platino por los átomos N-7 de dos guaninas consecutivas. Los estudios estructurales de aductos de entrecruzamiento intracatenario muestran que la doble hélice está fuertemente curvada hacia el surco mayor.



Tomado de *Zamble, D. B. y Lippard, S. J. En: B. Lippard (Ed.),* Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. *New York: Wiley-VCH 1999, p. 74.*

Las estructuras curvadas de los aductos DNA-cisplatino son reconocidas específicamente por varias proteínas de unión a DNA, entre las que hay que contar las proteínas de reparación por escisión (NER) y las del grupo de alta movilidad, como la HMG-1. Se ha propuesto que la citotoxicidad de los complejos de cisplatino es un proceso complicado mediado por interacciones específicas con estas proteínas. La formación de aductos DNA-cisplatino afecta a procesos celulares tales como la transcripción y la apoptosis (muerte celular programada). Las propias lesiones y los complejos proteicos con el DNA-cisplatino probablemente interfieren con la transcripción. Las proteínas NER son reclutadas para reparar la lesión, pero la reparación por escisión tiende a introducir roturas en las cadenas de DNA. La acumulación de estos cortes puede finalmente inducir la apoptosis, puesto que el DNA acaba por estar demasiado dañado para cumplir sus funciones. También se han propuesto mecanismos similares para explicar la citotoxicidad de otros compuestos que se unen al DNA, como el ditercalinio. Esta molécula bifuncional forma complejos no covalentes con el DNA que están fuertemente curvados. Se supone que la citotoxicidad procede de la inducción de rutas de reparación abortivas que producen roturas de las hebras del DNA.

Las interacciones de los complejos de DNA-cisplatino con las proteínas HMG pueden contribuir también a la citotoxicidad. La unión de las proteínas HMG puede señalar incorrectamente que la región dañada es transcripcionalmente activa e impedir la condensación de la cromatina. Estos complejos también pueden perpetuar la lesión, impidiendo la reparación del complejo DNA-cisplatino.

Zamble, D. B. y Lippard, S. J. The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA. En: B. Lippert (Ed.), *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.* New York: Wiley-VCH, 1999, pp. 73–134; y Lambert, B., Segal-Bendirdjian, E., Esnault, C., Le Pecq, J.-B., Roques, B. P., Jones, B. y Yeung, A. T. Recognition by the DNA repair system of DNA structural alterations induced by reversible drug–DNA interactions. *Anti-Cancer Drug Des.* 5:43, 1990.

que catalizan procesos tan importantes como la replicación, la transcripción y la recombinación específica de sitio. La curvatura inducida por la interacción del DNA con enzimas y otras proteínas, como las histonas, no requiere la presencia de secuencias de nucleótidos tan específicas como las necesarias para que el DNA forme codos en ausencia de proteínas. La curvatura también aparece como consecuencia de lesiones fotoquímicas o apareamiento incorrecto de bases en el DNA, y actúa como señal de reconocimiento para que se inicie la reparación del DNA. Los antibióticos antitumorales que producen estructuras curvadas se examinan en la Apli. Clín. 2.3.

DNA cruciforme

Las repeticiones invertidas son abundantes en el genoma humano y suelen encontrarse cerca de las regiones de control de los genes o en los orígenes de replicación del DNA. Se ha propuesto que las repeticiones invertidas podrían actuar como interruptores moleculares para la replicación y la transcripción. Las estructuras cruciformes se generan a partir de la rotura de los puentes de hidrógeno entre las cadenas complementarias y la formación de puentes de hidrógeno intracatenarios

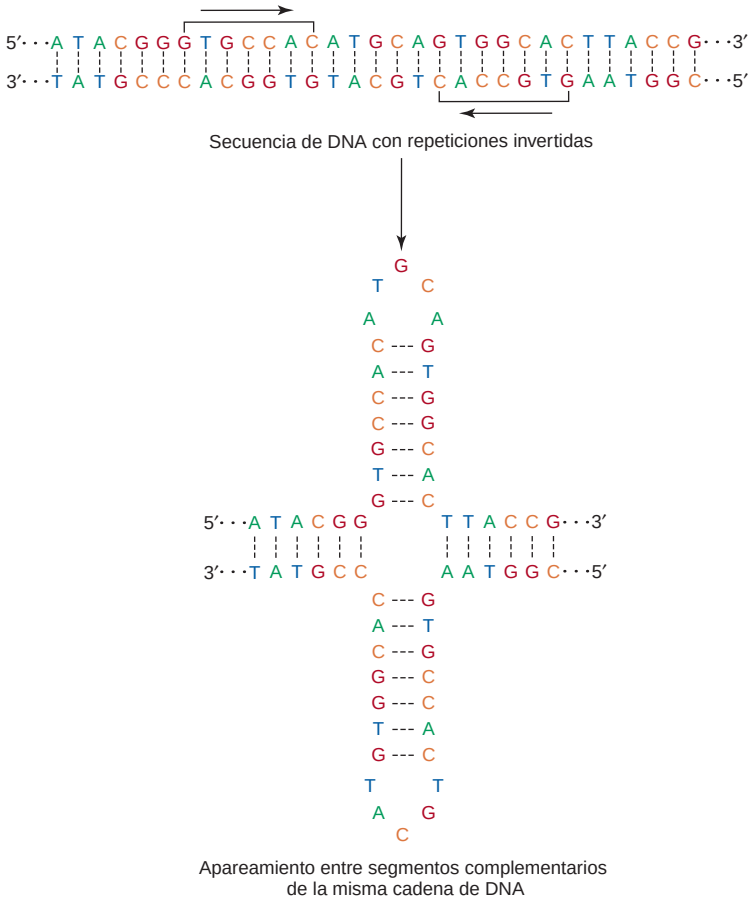


FIGURA 2.28
Formación de estructuras cruciformes en el DNA.
La existencia de repeticiones invertidas en el DNA de cadena doble es una condición necesaria, pero no suficiente, para la formación de estructuras cruciformes. Es poco probable que se formen estructuras cruciformes en el DNA relajado debido a que el DNA lineal acomoda más pares de bases apilados que la estructura cruciforme, lo que hace que la formación de esta última sea termodinámicamente desfavorable. Para producir una estructura cruciforme es necesario que se produzca un desenrollamiento seguido por la formación de puentes de hidrógeno intracatenarios entre las dos partes simétricas de la repetición. La formación de estructuras cruciformes no está favorecida en regiones de DNA con repeticiones especulares porque en tales cruciformes las cadenas de DNA serían paralelas en lugar de antiparalelas. En cambio, algunas repeticiones especulares tienden a formar hélices triples.

dentro de la región que contiene la secuencia invertida (Figura 2.28). Los lazos generados por la formación de la estructura cruciforme requieren el desapareamiento de 3–4 bases en el extremo de la "horquilla". Estas estructuras pueden ser sólo ligeramente desestabilizadoras, dependiendo de la secuencia, pues los residuos del lazo pueden permanecer apilados en el extremo de la hélice. Los datos en favor de que los cruciformes posean una función biológica, que en ningún caso ha sido establecida, son sólo circunstanciales.

DNA de triple hebra

En las décadas de 1950 y 1960 se mostró que algunas combinaciones de secuencias en polinucleótidos formaban complejos de triple hebra en lugar de las esperadas dobles hélices. Por ejemplo, el poli(dA) y el poli(dT) forma complejos con estequiometría 1:2. Un punto clave para resolver estas estructuras fue que al menos una de las hebras consiste en una secuencia de homopurina. Incluso cuando participan en apareamientos de Watson y Crick, las purinas poseen dos lugares para la formación de enlaces de hidrógeno en el surco mayor: el N-7 y el O-6 en la guanina y el N-7 y el 6-NH_2 en la adenina. Las bases en el surco mayor con disposiciones apropiadas

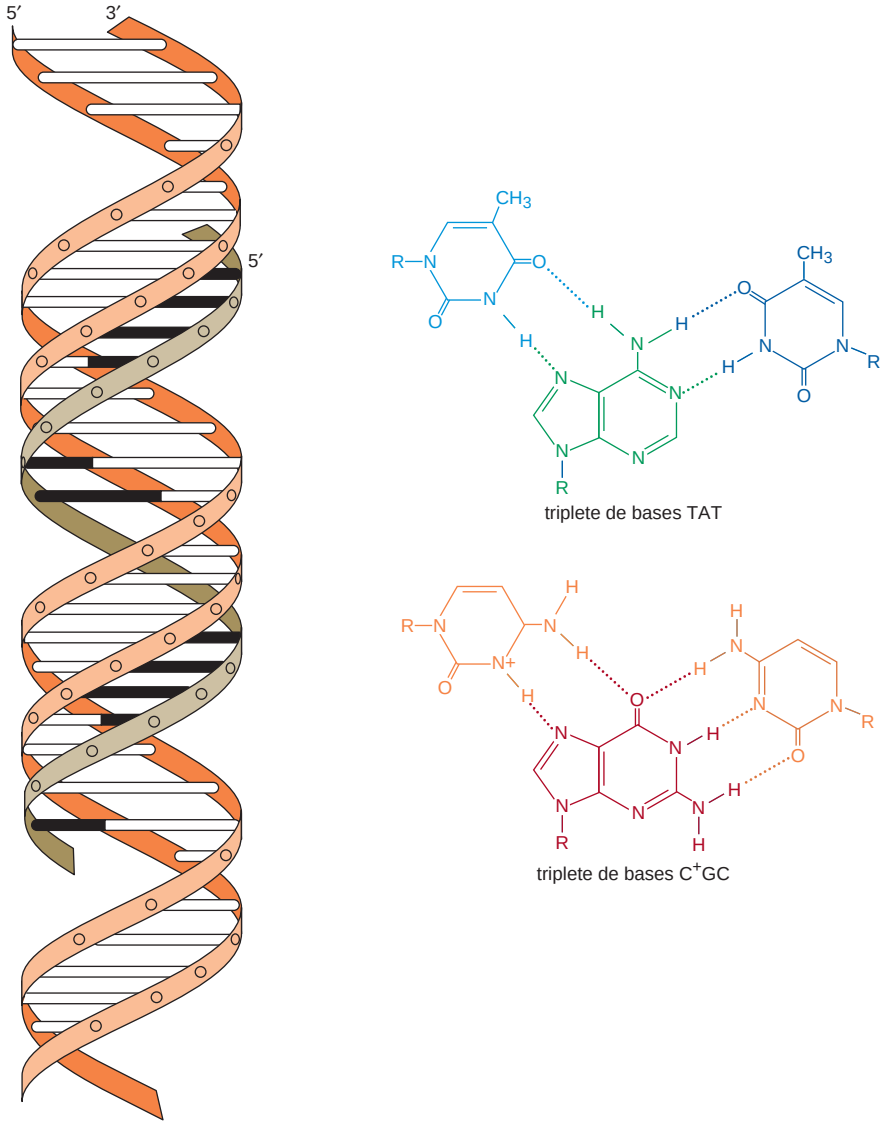


FIGURA 2.29
Triple hélice de Hoogsteen.
Las hélices triples pueden formarse mediante puentes de hidrógeno de Hoogsteen entre una cadena de homopurina de una doble hélice y una cadena paralela de homopirimidina. Los tripletes de bases isomorfos, TAT y C^+GC, son responsables de la especificidad de secuencia de la unión.

de dadores y aceptores de puentes de hidrógeno pueden formar tripletes de bases de **Hoogsteen** (Figura 2.29) o de **Hoogsteen inverso** (Figura 2.30). Por ejemplo, una timina puede formar selectivamente dos puentes de hidrógeno de Hoogsteen con la adenina de un par A-T. De la misma forma, una citosina protonada puede formar dos puentes de hidrógeno de Hoogsteen con la guanina de un par G-C, dando un triplete de bases isomorfo del T-A-T. El pK_a de la citidina es aproximadamente de 4,5, y las triple hélices que contienen tripletes de C-G-C manifiestan una fuerte dependencia del pH. Sin embargo, el efecto estabilizador del triplete eleva el pK_a aparente de la citosina, haciéndola más fácilmente protonable, incluso en disoluciones sólo ligeramente ácidas (pH 6). Al unirse a una secuencia de homopurina-homopirimidina (pu · py) de DNA, la tercera hebra se orienta paralelamente a la hebra rica en purinas y se une con elevada selectividad (Figura 2.29). Los patrones de puentes de hidrógeno de Hoogsteen de la guanina y la citosina suministran una especificidad similar a la de los pares de Watson y Crick. El patrón de puentes de hidrógeno Hoogsteen invertido también es posible si se invierte la orientación de la

tercera hebra (es decir, la hebra antiparalela de la hebra de purina, Figura 2.30). Se pueden formar tripletes específicos entre una adenina y un par A-T, así como entre una guanina y un par G-C. También puede formarse un triplete de Hoogsteen inverso entre timina y A-T, pero el triplete resultante no es isomorfo con los tripletes de pu · pu · py. Estos tripletes de bases no son isomorfos; es decir, el carbono 1′ de los azúcares de los residuos de la tercera hebra no se encuentra en la misma posición en relación con la doble hélice. No obstante, el esqueleto es capaz de acomodar las distorsiones que resultan de la incorporación de estos tripletes de bases.

En ambos motivos de la triple hélice, el apilamiento de las bases juega un importante papel en la estabilización de la estructura. Sin embargo, la aproximación

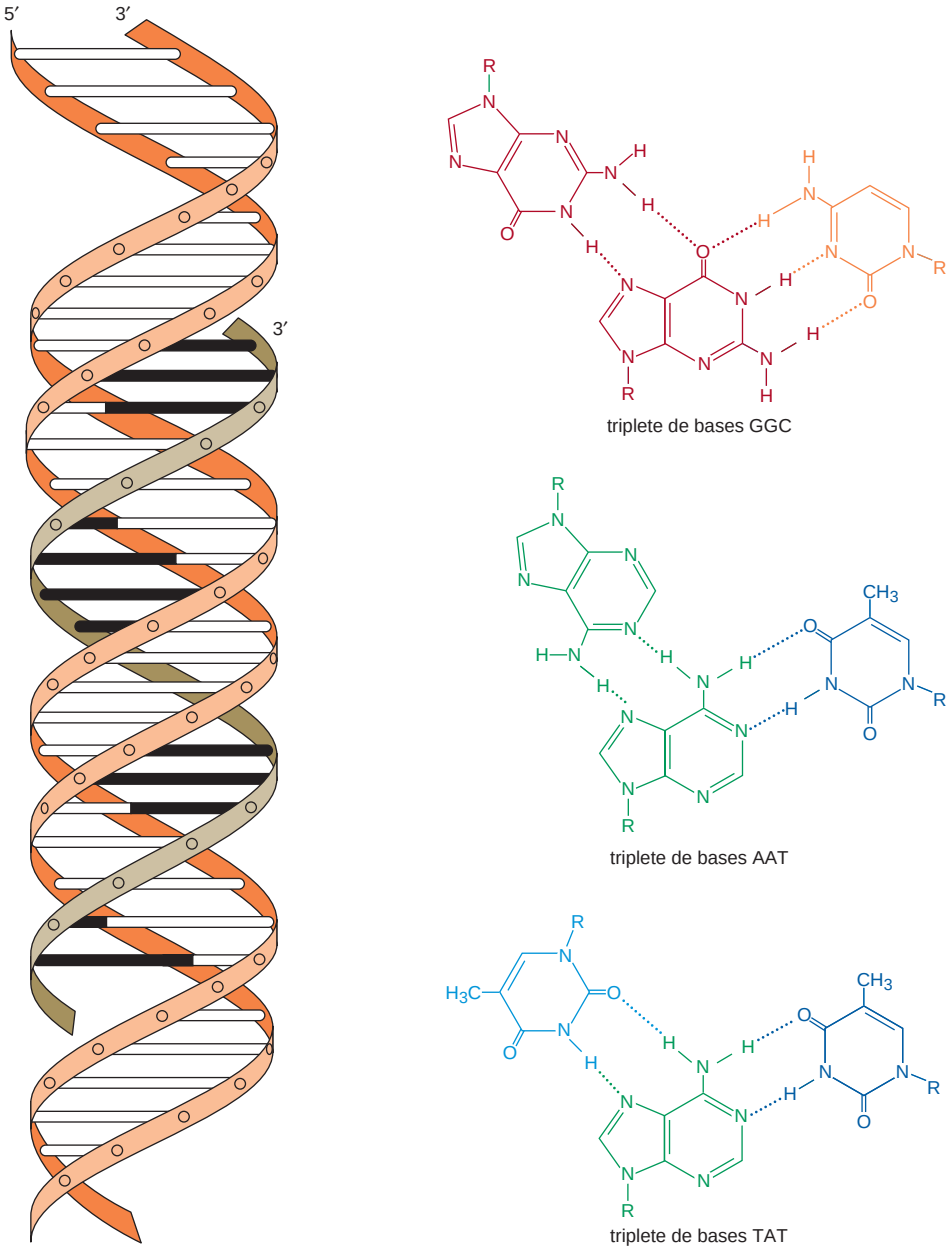


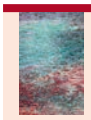
FIGURA 2.30
Triple hélice de Hoogsteen invertida.
Las hélices triples pueden formarse por unión antiparalela de un oligonucleótido a una cadena de homopurina de una doble hélice de Watson y Crick. Los puentes de hidrógeno de Hoogsteen invertidos dan lugar a tres posibles tripletes: GGC, AAT y TAT. Estos tripletes no son isomorfos porque los azúcares (representados por R) ocupan una posición diferente en relación con el par de Watson y Crick.

FIGURA 2.31
Triples hélices intramoleculares—DNA H.
Las regiones de polipurina-polipirimidina del DNA con simetría especular pueden formar una triple hélice intramolecular en la cual la tercera cadena se encuentra en el surco mayor, mientras que su complementaria adquiere la conformación de cadena sencilla.
Adaptado de Sinden, R. R. DNA Structure and Function. *New York: Academic Press, 1994.*

de las tres hebras de la triple hélice cargadas negativamente da lugar a un aumento considerable de la repulsión electrostática. La triple hélice es, pues, menos estable que la hélice doble de Watson y Crick. Además, la formación de la triple hélice es altamente dependiente de la concentración salina. En particular, la presencia de Mg^{2+} y de otros cationes multivalentes estabiliza la triple hélice al apantallar las cargas de los fosfatos.

Las hélices triples intramoleculares se pueden formar por la disociación de la estructura en doble hélice por secuencias especulares de polipurina. Una repetición especular es una secuencia como AGGGGA, que tiene la misma secuencia de bases cuando se lee en ambas direcciones desde un punto central. La renaturalización forma una región de cadena triple y un lazo de cadena sencilla, cuya estructura se conoce como **DNA H** (Figura 2.31). Aunque la formación del DNA H es termodinámicamente desfavorable, sobre todo por la pérdida de la interacciones de apilamiento en el lazo de cadena sencilla, se han observado hélices triples intramoleculares en DNA celular bajo tensión superhelicoidal. Parece ser que el superenrollamiento suministra la energía para la desnaturalización del DNA, necesaria para la formación de la triple hélice. La formación de hélices triples relaja el superenrollamiento negativo. La unión de proteínas al DNA de cadena sencilla puede estabilizar también la estructura del DNA H, impidiendo la degradación del lazo por las nucleasas.

Muchas secuencias de los genomas eucarióticos tienen la capacidad de formar estructuras de triple hebra. Estas regiones se presentan con una frecuencia mucho más alta de la que sería de esperar a partir de consideraciones meramente probabilísticas. Los segmentos de polipurina de más de 25 nucleótidos llegan a representar hasta el 0,5% de algunos genomas eucarióticos. Estas regiones con potencial para formar hélices triples son especialmente abundantes cerca de las secuencias implicadas en la regulación génica. Por esta razón se ha propuesto que el DNA H puede jugar un papel en el control de la transcripción (síntesis de RNA a partir de DNA). La capacidad del DNA de triple hélice de interferir en la transcripción ha estimulado los esfuerzos dirigidos a controlar artificialmente la síntesis de RNA, y la consiguiente síntesis de proteínas, mediante el uso de hélices triples intermoleculares. El potencial terapéutico de los oligonucleótidos capaces de formar DNA triple en regiones con potencial de apareamiento de Hoogsteen se trata en la Apli. Clín. 2.4. Se han propuesto múltiples funciones biológicas potenciales para el DNA de triple hélice; entre ellas, posibles efectos en la recombinación y en la iniciación y la terminación de la replicación. Sin embargo, no hay datos definitivos que prueben que el DNA de triple hélice posea una función biológica.



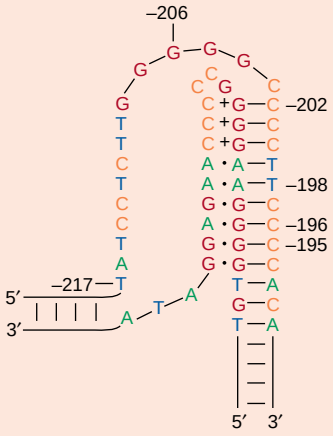
APLICACIÓN CLÍNICA 2.4
Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal

La persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (HPFH) es un grupo de dolencias en las cuales la síntesis de hemoglobina fetal no se detiene durante el desarrollo, sino que continúa durante la vida adulta. La forma homocigótica de esta enfermedad es extraordinariamente rara, y se caracteriza por cambios en los glóbulos rojos similares a los que se encuentran en los heterocigotos para la β-talasemia. La HPFH, ya sea de tipo homocigoto o heterocigoto, se asocia con ligeras anormalidades clínicas o hematológicas. Aunque los pacientes de HPFH son generalmente asintomáticos, pueden producirse ligeros dolores en la musculatura esquelética.

Esta enfermedad resulta de un fallo del control de la transcripción de los genes humanos de la Gγ- y la Aγ-globina. Los cromosomas afectados son incapaces de sustituir la síntesis de cadenas γ por la de cadenas β. La expresión de estos genes parece estar afectada de manera sustancial por la formación de una triple hélice intramolecular de DNA localizada 200 pb más arriba del sitio de iniciación de la transcripción, concretamente entre las posiciones –194 y –215.

Los genes de la hemoglobina de los pacientes contienen mutaciones en las posiciones –195, –196, –198 y –202. Las mutaciones en la posición –202 implican cambios de C a G y C a T; en la posición –198 de T a C; en la posición –196 de C a T; y en la posición –195 de C a G. Esta mutaciones tiene influencia en la estabilidad de la triple hélice intramolecular.

En general, la presencia de secuencias de polipurina–polipirimidina suficientemente largas para formar hélices triples intramoleculares tiende a reprimir la transcripción, mientras que los segmentos cortos de polipurina–polipirimidina son incapaces de inducir la formación de hélices triples y no tienen ningún efecto sobre la transcripción. En el caso de la HPFH, se ha observado una correspondencia notable entre los cambios de bases que desestabilizan la formación de la triple hélice y esta enfermedad genética.



Ulrich, M. J., Gray, W. J. y Ley, T. J. An intramolecular DNA triplex is disrupted by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 267:18649, 1992; y Bacolla, A., Ulrich, M. J., Larson, J. E., Ley, T. J. y Wells, R. D. An intramolecular triplex in the human gamma-globin 5′-flanking region is altered by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 270:24556, 1995.

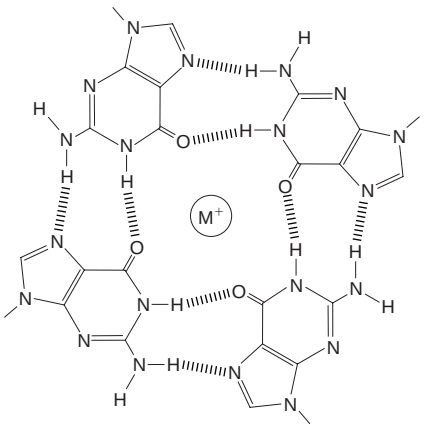


FIGURA 2.32
Estructura de un cuarteto de G.
Las cuatro guaninas coplanares forman una estructura tetramérica por formación de puentes de hidrógeno de Hoogsteen. La cavidad en el centro del cuarteto puede acomodar un ión sodio o potasio coordinado con los cuatro oxígenos O-6.

DNA de hebra cuádruple

Los nucleótidos de guanina y los polinucleótidos muy ricos en G forman estructuras tetraméricas denominadas **cuartetos de G**. Estas estructuras consisten en guaninas dispuestas en un plano y conectadas por enlaces de hidrógeno de Hoogsteen (Figura 2.32). Los cuartetos pueden apilarse unos sobre otros para formar una estructura con muchas capas. Son posibles diversas estructuras de cuatro hebras según la orientación relativa de las hebras. Cuando interaccionan cuatro polinucleótidos independientes es posible que las cuatro hebras estén dispuestas paralelamente (Figura 2.33). Hay también tres posibles isómeros con las hebras antiparalelas; estas formas predominan cuando uno de los polinucleótidos suministra dos o más hebras del **tetraplex** mediante plegamiento intramolecular. Todas estas estructuras están estabilizadas por cationes metálicos, especialmente sodio y potasio. Estos cationes interaccionan con los oxígenos de las guaninas (O-6), en el agujero que se forma en el centro del cuarteto. Los iones metálicos pueden encontrarse en el plano del cuarteto o entre dos planos adyacentes. En esta última disposición hay ocho oxígenos disponibles para coordinar el ión. La estabilización preferencial por Na^+ y K^+ en comparación con Li^+ o Cs^+ se debe al mejor encaje de aquéllos en la cavidad formada por el cuarteto: los iones de litio son demasiado pequeños y los de cesio demasiado grandes para una unión suficientemente estable. Los iones se encuentran completamente aislados en el interior de la estructura y sólo aquellos que se encuentran en los extremos del tetraplex pueden mantener la coordinación con las moléculas de agua. Además de la liberación entrópicamente favorable de moléculas de agua por los iones metálicos, éstos reducen la carga negativa global acumulada en la estructura de cuádruple hebra.

Las estructuras de cuádruple cadena de G se han observado por difracción de rayos X y espectroscopia de RMN, pero su existencia *in vivo* no ha sido demostrada. Sin embargo, hay procesos biológicos donde los polinucleótidos ricos en G juegan un papel importante, y para los cuales se ha propuesto un papel para el tetraplex de G. Los extremos de los cromosomas eucarióticos (**telómeros**) contienen secuen-

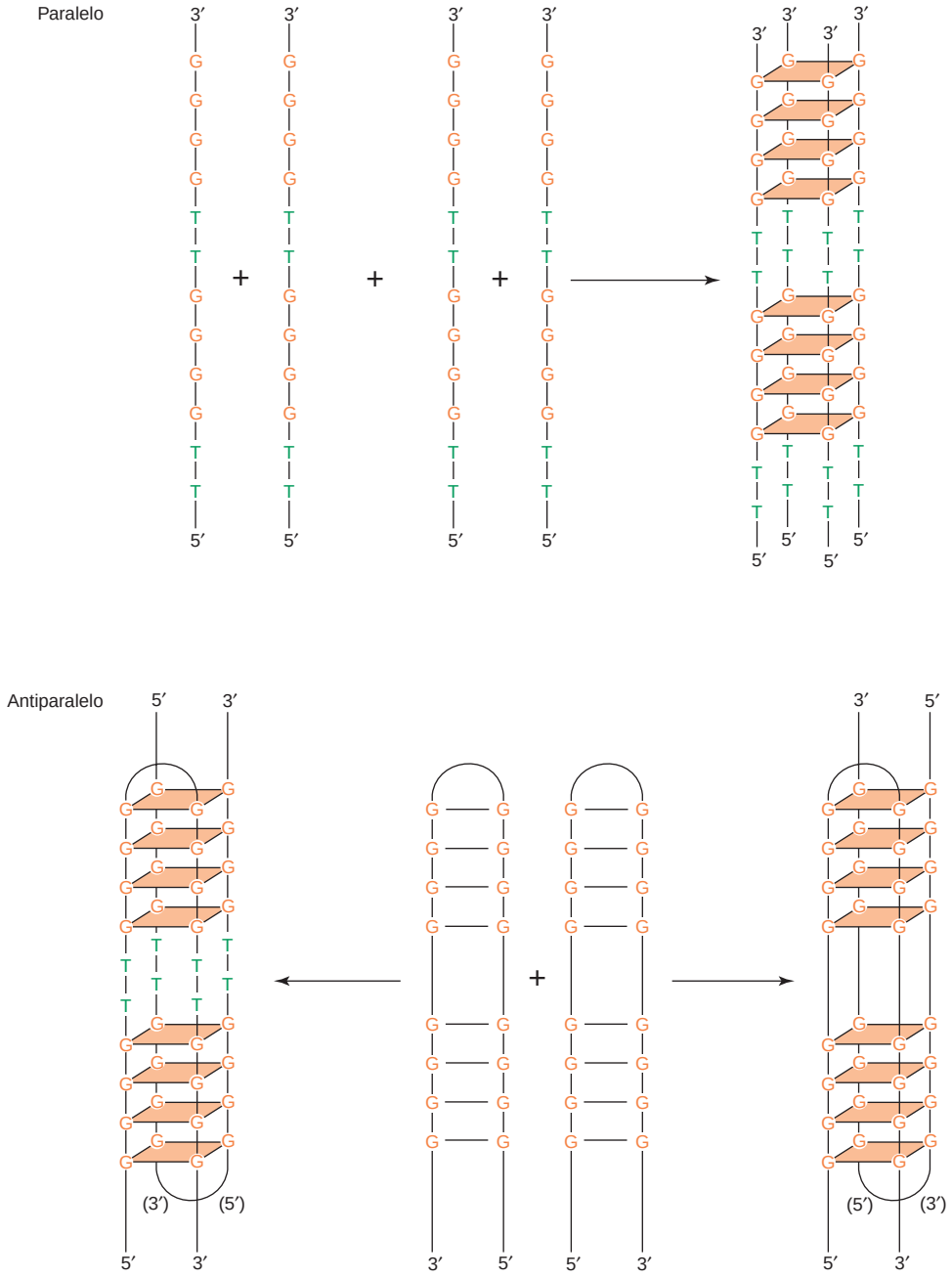
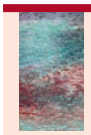


FIGURA 2.33
DNA de cuadrúplex de G.
El apilamiento de cuartetos de G puede dar lugar a estructuras de cuatro cadenas. Las estructuras en hélice cuádruple con las cuatro cadenas paralelas puede formarse a partir de cuatro cadenas sencillas de polinucleótidos ricos en G. Son posibles varias formas isómeras de los cuadrúplex con cadenas con orientación antiparalela. Esta disposición se presenta a menudo cuando un solo polinucleótido suministra dos o más hebras del cuadrúplex, y puede estar presente en la secuencias ricas en G del DNA telomérico. *Adaptado de Sinden, R. R.* DNA Structure and Function. *New York: Academic Press, 1994.*

cias repetitivas ricas en G. Los telómeros humanos contienen 800–2400 copias de la secuencia hexamérica repetida $(TTdAdGdGdG)_n$ y terminan en un extremo protuberante de cadena sencilla de unos 150 nucleótidos. Estudios *in vitro* indican que los oligonucleótidos con esta secuencia pueden formar tetraplex. No se sabe qué papel, si acaso tienen alguno, juegan los tetraplex en la función de los telómeros. Sin embargo, se están estudiando los telómeros como posibles dianas de nuevas quimioterapias contra el cáncer (véase la Apli. Clín. 2.5). Además, se ha propuesto la presencia de tetraplex de G en la recombinación de los genes de las inmunoglobulinas y en la dimerización del RNA genómico de doble cadena del virus humano de la inmunodeficiencia (VIH).

La investigación de estructuras de cuádruple cadena potenciales en las secuencias ricas en guanina de los telómeros ha llevado a la identificación de otra estructura de cuádruple hebra que afecta a las secuencias complementarias ricas en citosina. La difracción de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN) han mostrado



APLICACIÓN CLÍNICA 2.5
La telomerasa como diana de agentes anticancerígenos

Los telómeros, los extremos de los cromosomas eucarióticos lineales, son fundamentales para el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Los telómeros se acortan progresivamente en cada división celular. Cuando alcanzan una longitud crítica se produce la muerte celular programada (apoptosis). La ribonucleoproteína telomerasa actúa para mantener o alargar la longitud de los telómeros, pero no es activa en las células somáticas normales. La actividad telomerasa se ha detectado en la mayoría de las líneas celulares tumorales y puede ser responsable de su inmortalización. El incremento de la actividad telomerasa en tumores está asociado a un pronóstico clínico negativo. Por lo tanto, este enzima es una diana prometedora para la quimioterapia contra el cáncer.

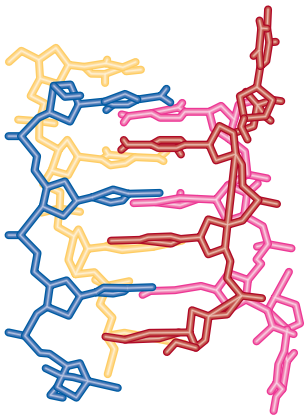
Se han ensayado dos procedimientos para la inhibición selectiva de la telomerasa. El primero está dirigido contra la porción de RNA del enzima. El RNA sirve de molde para la extensión de la secuencia telomérica repetitiva. Los ácidos nucleicos modificados como el 2′-*O*-metil RNA y los ácidos nucleicos peptídicos se unen al RNA telomérico en las células humanas inmortales e inhiben la actividad telomerasa. Este tratamiento causa finalmente la muerte celular. Estos derivados de los ácidos nucleicos fueron elegidos por su resistencia a la degradación por nucleasas y por su elevada afinidad para formar complejos de hélice doble con el RNA. Un segundo procedimiento para la inhibición de la telomerasa consiste en usar compuestos que se unan a los cuadrúplex de G del DNA. Moléculas aromáticas grandes como, por ejemplo, las porfirinas y las antraquinonas se unen selectivamene a los cuadrúplex de G del DNA y los estabilizan. Aunque la existencia *in vivo* de los cuadrúplex de G no haya sido demostrada, se ha visto que algunos de estos compuestos inhiben la actividad telomerasa. Se necesitarán más estudios para determinar las actividades antitumorales de estos compuestos.

Herbert, B.-S., Pitts, A. E., Baker, S. I., Hamilton, S. E., Wright, W. E., Shay, J. W. y Corey, D. R. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14276, 1999; y Sun, D., Thompson, B., Cathers, B. E., Salazar, M., Kerwin, S. M., Trent, J. O., Jenkins, T. C., Neidle, S. y Hurley, L. H. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.* 40:2113, 1997.

que los oligodesoxirribonucleótidos ricos en C pueden formar un tipo completamente nuevo de complejo de cuatro hebras, denominado **DNA i** (Figura 2.34). Esta estructura está formada por dos dúplex mutuamente intercalados que forman una estructura de cuatro hebras. Los dúplex están formados por dos cadenas paralelas unidas por pares de bases C-C. En lugar de apilarse con los pares de bases vecinos, cada par C-C se apila con pares C-C del segundo dúplex, formando un complejo interdigitado de cuatro cadenas. Los dúplex tienen orientación antiparalela uno con respecto al otro. La estructura está estabilizada por la protonación de una de las citosinas en N-3. Ello permite la formación de tres puentes de hidrógeno en el par C-C, y las cargas positivas contrarrestan parcialmente la repulsión intercatenaria de los fosfatos. Aunque se ha demostrado que las secuencias teloméricas ricas en C pueden formar complejos de DNA i, su estabilidad mucho mayor a pH 5-6 arroja dudas sobre su importancia fisiológica. Sin embargo, su inusual arquitectura pone de manifiesto la variabilidad estructural que es posible en los ácidos nucleicos.

DNA deslizado

Las regiones de DNA que presentan repeticiones directas pueden formar estructuras conocidas como DNA incorrectamente apareado por deslizamiento (SMP-DNA). Estas estructuras se forman mediante el desenrollamiento de la doble hélice y el realineamiento y posterior apareamiento de una copia de la repetición directa con la copia adyacente en la otra cadena. El realineamiento genera dos bucles de cadena



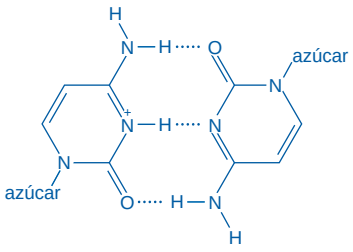


FIGURA 2.34
DNA i.
Otro DNA de cuatro hebras, que puede estar relacionado con el DNA telomérico, está formado por cadenas ricas en C. El DNA i consiste en dos dúplex interdigitados que contienen pares de bases C-C. La protonación favorable de una de las citosinas en cada par explica la mayor estabilidad de esta estructura a pH ácido.
Adaptado de Feigon, J. Curr. Biol. *3:611, 1993.*

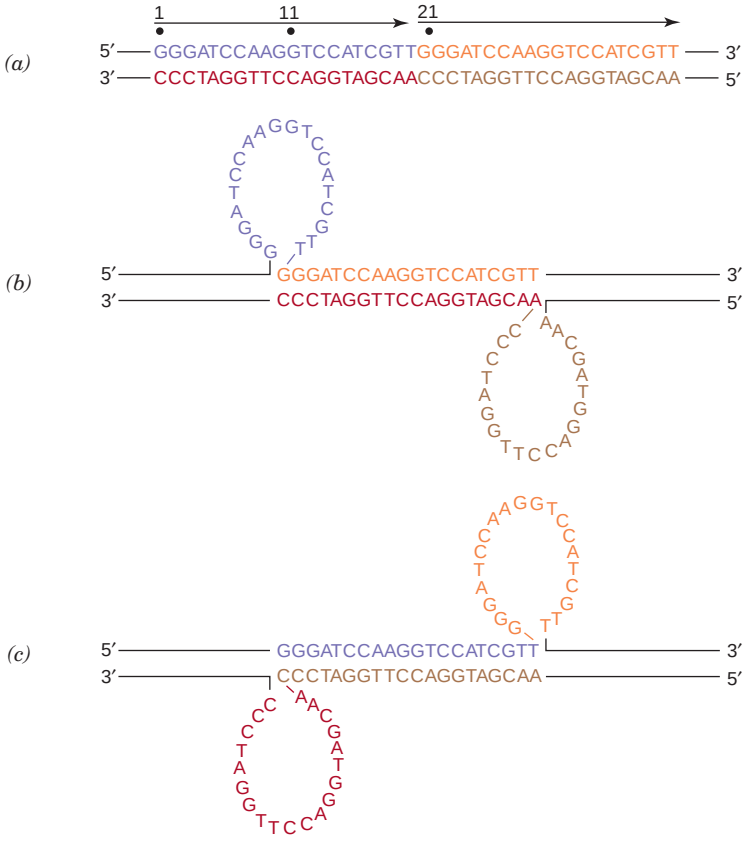


FIGURA 2.35
DNA deslizado y mal apareado.
La presencia de dos repeticiones en tándem adyacentes (*a*) puede dar lugar a dos isómeros de DNA deslizado y mal apareado. En uno de estos isómeros (*b*) la segunda copia de la repetición directa de la hebra superior se aparea con la primera copia de la repetición de la hebra inferior. El apareamiento de la primera copia de la repetición directa de la hebra superior con la segunda copia de la repetición directa de la hebra inferior produce el segundo isómero (*c*). En ambos isómeros se generan un par de bucles de cadena sencilla.

sencilla (Figura 2.35). Pueden darse dos formas isómeras distintas de un SMP-DNA. La primera genera un bucle con la repetición directa en el extremo 5′ de ambas cadenas y la otra produce un bucle en el extremo 3′ de la repetición directa. Aunque el SMP-DNA no se ha logrado identificar todavía *in vivo*, los datos genéticos sugieren que este tipo de DNA está sin duda asociado a la mutagénesis espontánea por desplazamiento de marco de lectura, que da lugar a inserciones y deleciones en secuencias de una sola base (Figura 2.36). Deleciones y duplicaciones de segmentos de DNA de longitud superior a una base pueden aparecer entre repeticiones directas durante la replicación del DNA, originando bucles por deslizamiento. La dupli-

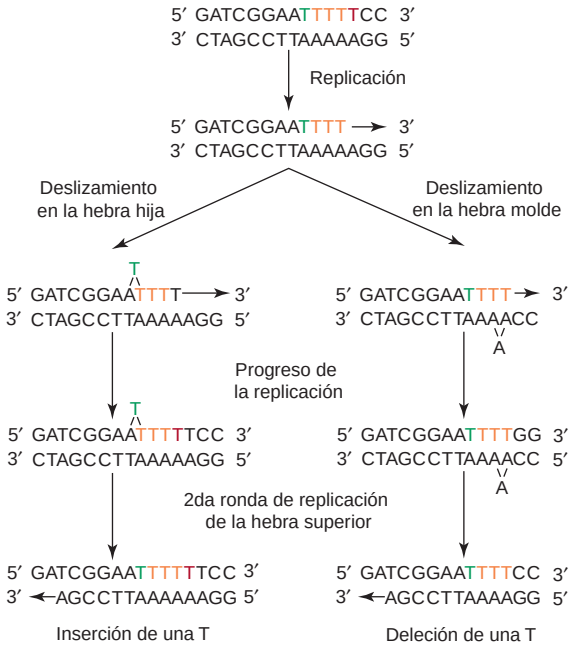
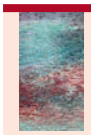


FIGURA 2.36
Mutagénesis por desplazamiento del marco de lectura por deslizamiento del DNA.
La replicación del DNA en un segmento compuesto de una sola base puede producir un desplazamiento del marco de lectura de una sola base. En el ejemplo de la figura, se replica un segmento de cinco A y, dependiendo de si el deslizamiento se produce en la cadena hija o en la cadena molde, una T puede ser añadida o eliminada del DNA.

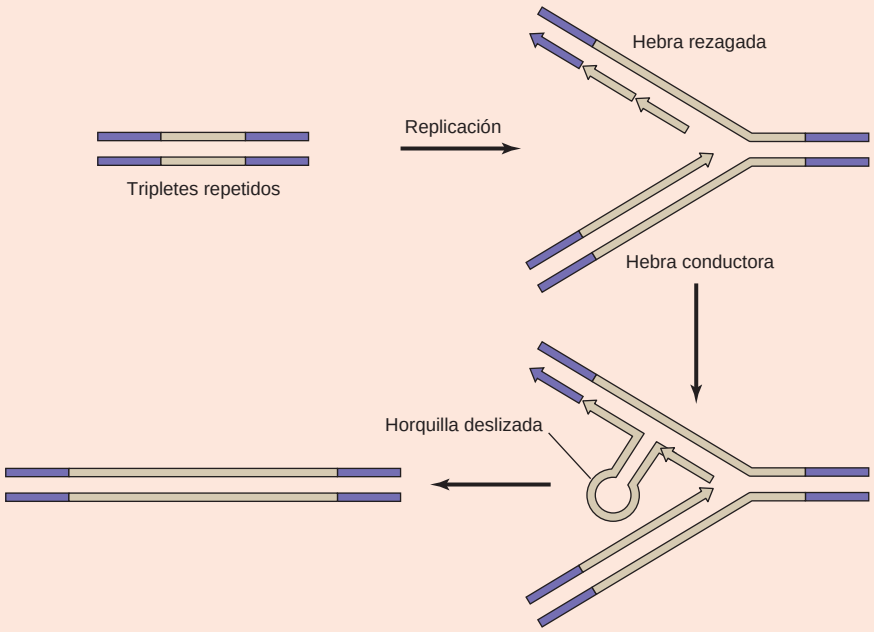


APLICACIÓN CLÍNICA 2.6
Expansión de tripletes repetidos y enfermedades humanas

Se ha observado la presencia de secuencias de DNA reiterado, consistentes en tres pares de bases, en numerosas enfermedades genéticas humanas, entre ellas el síndrome del cromosoma X frágil, la distrofia miotónica, la atrofia muscular bulbar y espinal ligada al cromosoma X (síndrome de Kennedy), la ataxia espinocerebelar, y la enfermedad de Huntington. Estas enfermedades están asociadas con la expansión de ciertas repeticiones de tripletes que aparecen representadas en exceso en el genoma humano. Las repeticiones pueden estar presentes en diferentes localizaciones, cerca o dentro del gen asociado. En todos los casos, la expansión del triplete interfiere con el funcionamiento normal de la proteína. En muchos casos se pierde la función de la proteína, pero en algunos otros hay ganancia de una función deletérea. El síndrome del cromosoma X frágil, una causa principal de retraso mental, se caracteriza por la expansión del triplete GCC. Las enfermedades asociadas con la expansión de tripletes se caracterizan por un incremento de su gravedad con las sucesivas generaciones, hecho conocido como anticipación. Normalmente se encuentran unas 30 copias de dicho triplete en el extremo 5′ del gen asociado con la enfermedad, el gen *FMR-1*. La zona de la repetición puede expandirse hasta contener unas 300 copias en varones portadores de mutaciones en el gen del cromosoma X frágil, que no manifiestan síntomas de la enfermedad. La descendencia de varones portadores que manifiestan la enfermedad puede mostrar una expansión extraordinaria del triplete repetido, con varios millares de copias. La enfermedad se desarrolla cuando el gen *FMR-1* deja de expresarse normalmente. La metilación de los dinucleótidos CpG de los tripletes CGG parece estar asociada con el cese de la expresión del gen *FMR-1*.

La expansión de los tripletes puede ser el resultado del mal apareamiento por deslizamiento durante la síntesis del DNA. Debido a la amplificación masiva que caracteriza las enfermedades asociadas con la expansión de tripletes, sería necesario que se produjera el deslizamiento múltiple o repetido para explicar una tasa tan elevada de expansión. Un mecanismo posible de expansión sería el deslizamiento del DNA naciente durante la síntesis de la hebra rezagada. Este proceso puede ser favorecido por la formación de una estructura en horquilla estable por el bucle deslizado. La repetición de este proceso llevaría a la acumulación de un gran número de tripletes repetidos que provocarían la enfermedad.

Timchenko, L. T. y Caskey, C. T. Triplet repeat disorders: discussion of molecular mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:1432, 1999. Figua adapatada de Wells, R. D. *J. Biol. Chem.* 271:2875, 1996.



cación de ciertos tripletes repetidos, que provoca varias enfermedades genéticas humanas (véase la Apli. Clín. 2.6), podría producirse mediante este mecanismo.

2.4 ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR DEL DNA

Con excepción de los virus de RNA, toda la vida sobre la Tierra usa el DNA para almacenar la información genética. El tamaño del DNA varía según la especie, desde unos pocos miles de pares de bases en el DNA de los virus pequeños hasta millones en las bacterias o miles de millones en las plantas y los animales. En todos los organismos, la **longitud de contorno** (la longitud del DNA suponiendo que se en-

cuentre en forma B) del DNA genómico es mucho mayor que el tamaño de la célula que lo contiene. Por ejemplo, un virus de tamaño medio como el fago λ contiene $4{,}8 \times 10^4$ pb de DNA, que tiene una longitud de 16,5 μm. Sin embargo, la longitud de la partícula vírica es de sólo 0,19 μm. La bacteria común *Escherichia coli* tiene aproximadamente 2 μm de longitud y posee un único cromosoma con $4{,}6 \times 10^6$ pb y una longitud de contorno de 1,5 mm. El tamaño del DNA de las células superiores es incluso mayor. Una única célula humana diploide contiene 6×10^9 pb de DNA cromosómico empaquetado en 46 cromosomas. La longitud de contorno de este DNA se acerca a los 2 metros, y se halla contenido en un núcleo de unos 10 μm de diámetro. Es, pues, evidente que el DNA de todos los organismos se encuentra cuidadosamente empaquetado.

El DNA genómico puede ser lineal o circular

Con excepción del DNA de pequeños bacteriófagos tales como ϕX174, que puede presentarse en forma de cadena sencilla, la mayor parte del DNA es de cadena doble. Según su origen, el DNA puede ser lineal o circular. Por ejemplo, los DNA de varios virus pequeños son **hélices lineales de doble cadena**. Ciertos DNA presentan roturas interiores de la cadena sencilla de origen natural. Las roturas que se encuentran en moléculas naturales de los bacteriófagos provienen en su mayoría de enlaces fosfodiéster rotos, aunque en algunas ocasiones falta un desoxirribonucleósido. El DNA del fago T5 está constituido por una hebra intacta y una hebra complementaria, la cual está formada, en realidad, por cuatro fragmentos complementarios bien definidos y ordenados perfectamente a lo largo de la hebra intacta. En el fago B3, de *Pseudomonas aeruginosa*, se observa una regularidad semejante en la distribución de los puntos de rotura de las hebras, pero, en general, las roturas interiores parecen estar distribuidas al azar. La estructura en doble hélice se mantiene porque los cortes en una hebra se hallan, generalmente, en localizaciones diferentes de la de los cortes de la hebra complementaria. Los cromosomas de los organismos superiores también pueden ser lineales. Por ejemplo, cada uno de los 46 cromosomas de una célula diploide humana es un DNA lineal que contiene dos hebras muy largas de DNA que forman una doble hélice.

El **DNA circular** es el resultado de la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3′ y 5′ de los polinucleótidos lineales. Las primeras indicaciones a favor de la naturaleza circular del DNA de cadena sencilla del fago ϕX174 tuvieron su origen en la constatación de la ausencia de extremos accesibles al ataque de las exonucleasas. Los estudios de sedimentación también revelaron que una rotura interna producía un solo polinucleótido. Estos resultados fueron confirmados posteriormente mediante la observación directa con el microscopio electrónico.

Los DNA de doble hebra también pueden circularizarse por unión de cada una de las hebras con enlaces fosfodiéster. Este proceso se ha observado en el DNA lineal del fago λ. Antes de penetrar en *E. coli*, la célula huésped, el DNA del fago es lineal y de doble cadena, con extremos 5′ protuberantes de cadena sencilla en cada cadena. Estos extremos protuberantes tienen aproximadamente 20 nucleótidos y tienen secuencias complementarias. Después de la infección del huésped, se produce la circularización por hibridación entre los extremos. La formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3′ y 5′ de cada hebra por el enzima **DNA ligasa** produce un círculo cerrado covalentemente (Figura 2.37). Obviamente, las hebras de un DNA circular no pueden separarse irreversiblemente por desnaturalización porque forman círculos cerrados entrelazados. La ausencia de extremos 3′ y 5′ representa una ventaja evolutiva porque confiere una resistencia total frente a las exonucleasas, que aumenta la longevidad del DNA.

El DNA natural de numerosos organismos se encuentra en forma circular. Muchos virus tienen DNA circular en algún momento de su ciclo vital. La mayor parte (sino la totalidad) del DNA bacteriano se encuentra en forma de círculos cerrados. Esto incluye tanto a los cromosomas bacterianos como a las formas extracromosómicas menores denominadas **plásmidos**. El DNA plasmídico tiene generalmente unos pocos miles de pares de bases y contiene genes accesorios, como los de resistencia a antibióticos. Los plásmidos se mantienen y se replican con independencia del DNA cromosómico. Una bacteria puede contener centenares de copias de un plásmido determinado. Otros organismos, como las levaduras, también contienen plásmidos circulares. Las mitocondrias y los cloroplastos de las células eucarióticas

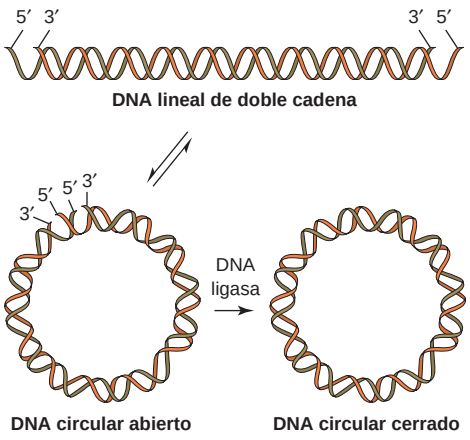


FIGURA 2.37
Circularización del DNA de λ.
El DNA del bacteriófago λ puede encontrarse en forma lineal y en forma circular, las cuales son interconvertibles. La circularización del DNA λ es posible gracias a que los extremos 5′ cohesivos de la forma lineal son complementarios.

contienen DNA circulares. Estos DNA tienen un tamaño similar al de los cromosomas bacterianos (200–1500 × 10^3 pb) y codifican proteínas exclusivas de estos orgánulos. La presencia de un "genoma" independiente y su parecido con las cianobacterias ha sugerido la hipótesis de que estos orgánulos proceden de bacterias que establecieron una relación simbiótica con las células eucarióticas hace miles de millones de años.

El DNA circular es superhelicoidal

El DNA circular de doble cadena se forma por unión de los extremos libres de un DNA lineal. Si no se realizan más manipulaciones, el DNA circular resultante estará **relajado**; es decir, poseerá la estructura termodinámicamente favorable del DNA B. Sorprendentemente, el DNA relajado tiene una actividad muy reducida en una serie de procesos biológicos cruciales, entre los que se encuentran la replicación, la traducción y la recombinación. El DNA biológicamente activo es **superhelicoidal**, un isómero sujeto a tensión topológica creado por el subenrollamiento o el sobrenrollamiento de la doble hélice. Antes de ligar los extremos de un DNA lineal en forma B para formar un círculo relajado, el DNA contiene unos 10,5 pb por vuelta. Si el DNA se desenrolla antes de cerrar el círculo, la estructura resultante se encontrará bajo tensión (Figura 2.38). El desenrollamiento de la hélice reduce el número total de vueltas de hélice presentes en la estructura circular. Hay dos maneras de acomodar el subenrollamiento de la hélice. Una consiste en suprimir el apareamiento en una pequeña región del DNA, formando un par de lazos de cadena sencilla en una estructura circular relajada. La pérdida de apilamiento de bases en esta estructura resulta energéticamente desfavorable. Sin embargo, si se mantiene todo el apilamiento de las bases, el subenrollamiento genera una tensión torsional en el esqueleto de la doble hélice. Para liberar esta tensión, la molécula entera de DNA puede enrollarse en la dirección opuesta a la de la rotación inicial. El resultado es la formación de una hélice espiralada, mejor conocida como **superhélice**. El DNA subenrollado se designa como superespiralado negativamente, y la

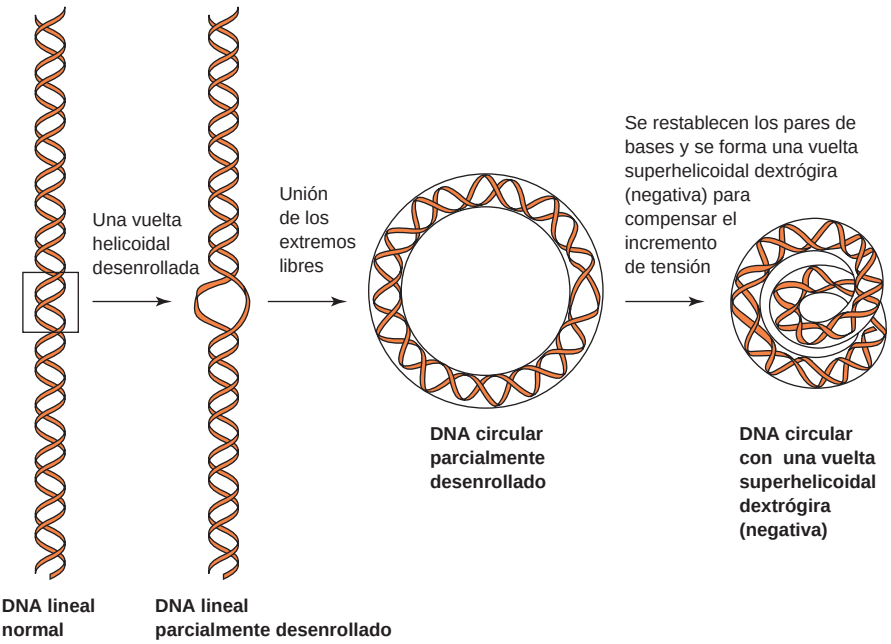


FIGURA 2.38
DNA superhelicoidal negativo.
Las superhélices dextrógiras (DNA superhelicoidal negativo) se forman si el DNA relajado está parcialmente desenrollado. El desenrollamiento puede provocar la rotura de los puentes de hidrógeno o, alternativamente, producir vueltas superhelicoidales negativas, las cuales se forman para compensar el incremento de tensión que sufre el DNA cuando se restablecen los pares de bases que se habían separado.
Adaptado de Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. Molecular Cell Biology. *New York: Freeman, 1986.*

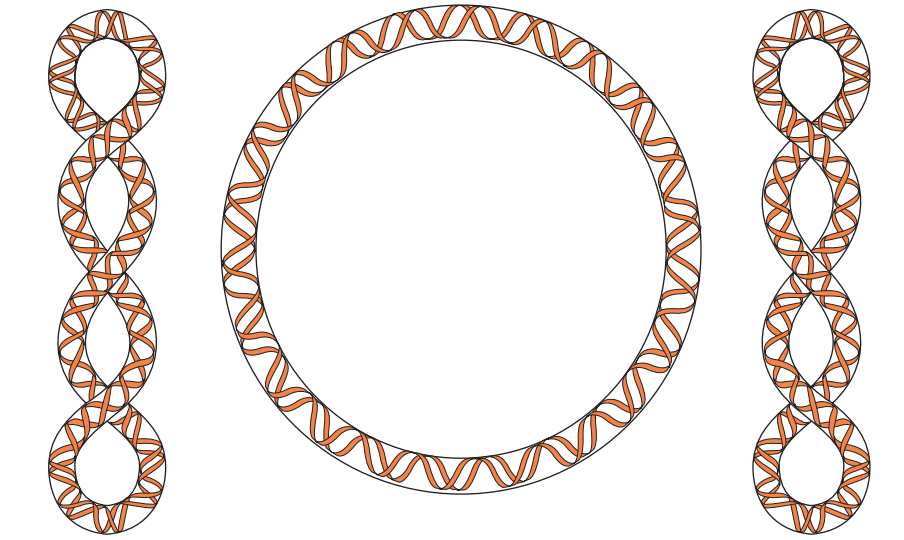


FIGURA 2.39
DNA relajado y superhelicoidal.
El DNA relajado puede convertirse en superhelicoidal dextrógiro o levógiro. El DNA superhelicoidal dextrógiro (superespiralado negativamente) es la forma que está generalmente presente en las células. El DNA superhelicoidal levógiro (superespiralado positivamente) puede generarse transitoriamente cuando el DNA se somete a transformaciones catalizadas enzimáticamente (replicación, recombinación, etc.) y también se encuentra en algunas especies bacterianas. La figura muestra los distintos patrones de plegamiento para los DNA superhelicoidales dextrógiros y levógiros.
Adaptado de Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. Molecular Cell Biology. *New York: Freeman, 1986.*

superhélice resultante es dextrógira (Figura 2.39). Del mismo modo, el DNA sobrenrollado está superespiralado positivamente y forma una superhélice levógira. En general, se establece un compromiso dinámico entre la rotura de los puentes de hidrógeno y la superespiralación. En la práctica, esto significa que el DNA superhelicoidal puede consistir en estructuras superhelicoidales con una mayor tendencia a generar regiones con los puentes de hidrógeno rotos (burbujas).

En el DNA circular inicialmente relajado, el desenrollamiennto transitorio de las hebras introduce superenrollamientos compensatorios. Sin embargo, si el DNA es inicialmente superhelicoidal, la densidad superhelicoidal fluctuará con la "respiración" de la hélice. Todos los DNA naturales están subenrollados y tienen déficit de vueltas helicoidales. Se encuentran, pues, superespiralados negativamente y presentan una densidad superhelicoidal notablemente constante en los diferentes DNA. Normalmente se encuentra una vuelta superhelicoidal negativa por cada 20 vueltas de hélice. La tensión superhelicoidal de una hélice sobrenrollada puede ser eliminada por el superenrollamiento positivo o por el desenrollamiento de una doble hélice levógira. Las vueltas superhelicoidales positivas pueden ser generadas por enzimas especializados, las topoisomerasas, y pueden estar presentes transitoriamente *in vivo*, pero raramente se encuentran en el DNA celular.

Los superenrollamientos positivos y negativos pueden, en principio, coexistir temporalmente en una misma molécula de DNA. Si hay un mismo número de vueltas superhelicoidales positivas y negativas, esta molécula de DNA puede seguir siendo considerada como "relajada", ya que puede volver al estado relajado sin la rotura de enlaces fosfodiéster. Podemos usar como modelo una goma elástica, que en su forma normal no tensionada, puede considerarse como una estructura circular relajada (sin vueltas superhelicoidales) (Figura 2.40). Si sujetamos firmemente la goma elástica por los lados opuestos, al hacer girar uno de los lados obtendremos una estructura caracterizada por dos dominios topológicos que giran en sentido opuesto, que son claramente visibles al separar los dos lados. Si acercamos de nuevo los lados opuestos cada dominio se enrolla sobre sí mismo, es decir, cada do-

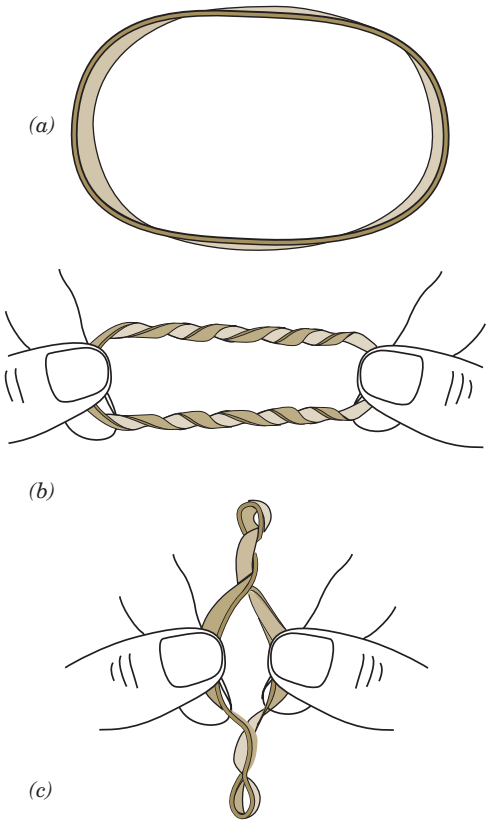


FIGURA 2.40
Modelo del DNA superhelicoidal.
Las propiedades topológicas del DNA circular de doble cadena pueden representarse con la ayuda de una banda elástica. La forma relajada de la banda, que se muestra en (*a*), ha sido retorcida para generar dos dominios distintos, que se mantienen separados con los dedos (*b*). En la parte superior de la goma se han introducido vueltas levógiras (en sentido contrario a las agujas del reloj), mientras que en la parte inferior se han introducido, para compensar, vueltas dextrógiras (en el sentido de las agujas del reloj). Cuando los dedos que sujetan los dominios se aproximan, tal como se muestra en (*c*), la porción superior que contenía los giros levógiros forma una superhélice dextrógira, mientras que la porción inferior produce una superhélice levógira. La superhelicidad no es, pues, una propiedad de una molécula de DNA considerada en su totalidad, sino más bien una propiedad de dominios específicos del DNA.
Adaptado de Sinden, R. R. y Wells, R. D. Curr. Opin. Biotech. *3:612, 1992.*

minio genera un superenrollamiento. Este proceso requiere un aporte de energía, ya que el estado superenrollado no representa el estado de mínima energía de la goma elástica. Cuando dejamos de sujetar los dos extremos de la goma haciendo posible la rotación, la goma volverá a su forma relajada inicial. Durante estas manipulaciones la estructura física de la goma permanece intacta. Una diferencia entre el modelo de la goma elástica y el DNA celular, es que este último se encuentra casi exclusivamente en forma superenrollada.

Descripción geométrica del DNA superhelicoidal

La topología del DNA circular puede describirse matemáticamente por tres valores: el **número de enlace**, el **número de torsión** y el **número de retorcimiento** (*writhing*). El número de enlace, *L*, es un número entero y se define como el número de veces que una hebra está enrollada en torno a la otra. En los DNA circulares este número es constante, mientras que no se rompa ningún enlace covalente. El enrollamiento dextrógiro produce valores de *L* positivos. El número de vueltas de la doble hélice del DNA define el número de torsión, *T*. En el DNA B, el número de torsión puede determinarse dividiendo el número de pares de bases por 10,5, el valor promedio de pares de bases por vuelta helicoidal. En un DNA circular cerrado relajado en conformación B, una hebra da una vuelta en torno a la otra cada 10,5 pb. Por lo tanto, en este caso, el número de enlace es igual al número de torsión ($L = T$). Sin embargo, no siempre es así. En el DNA que ha sido subenrollado o sobrenrollado entes del cierre de la estructura circular, el número de enlace ha cambiado. El desenrollamiento o el sobrenrollamiento (si es factible) local de la doble hélice libera la tensión y va acompañado de un cambio del número de torsión, de forma que $\Delta L = \Delta T$. Sin embargo, tal como se ha dicho anteriormente, el DNA prefiere mantener la estructura en la forma B incorporando superhélices para liberar la tensión. El número de vueltas superhelicoidales define el numero de retorcimiento, *W*. Un vuelta superhelicoidal puede compensar un cambio similar del número de enlace; por lo tanto, si la torsión no ha cambiado, $\Delta L = \Delta W$. Sin embargo, el DNA circular puede compensar los cambios de enlace incorporando a la vez cambios en torsión y retorcimiento. Esta relación puede describirse con la ecuación

$$\Delta L = \Delta T + \Delta W$$

Para cualquier DNA circular el número de enlace es igual a la suma de los números de torsión y de retorcimiento,

$$L = T + W$$

Por lo tanto, los DNA con un determinado valor de número de enlace pueden adquirir varias conformaciones topológicas y se pueden formar diferentes tipos de superhélices. Sin embargo, todas las conformaciones con el mismo número de enlace son interconvertibles sin romper ningún enlace covalente. Por lo tanto, el número de enlace es una constante para cualquier DNA circular cerrado covalentemente.

Las diferentes formas de DNA superhelicoidales pueden describirse utilizando los números *L, T* y *W*. El ejercicio mental que se muestra en la Figura 2.41 ilustra cómo se aplican estos conceptos. Debe recordarse que las vueltas de la doble hélice típica son dextrógiras. Por tanto, si se desenrolla un dúplex hipotético de DNA lineal que tenga 10 vueltas de longitud ($L = 10$ y $T = 10$) en una vuelta, la estructura resultante tendrá las siguientes características: $L = 9$ y $T = 9$. Se puede formar una estructura potencialmente equivalente si se fijan los extremos del mismo DNA de manera que no puedan girar, y se retuerce la molécula en dirección contraria a las agujas del reloj. Dado que en este caso no es posible el desenrollamiento, el número de vueltas de hélice permanece inalterado; esto es, $T = 10$. No obstante, y como resultado de las operaciones de formación de bucle, el número de enlace se ha reducido en 1; es decir, $L = 9$. La estructura que se obtiene como resultado de esta introducción deliberada de un bucle es visiblemente superhelicoidal. Además, la aplicación de la ecuación que relaciona los valores de *L*, *T*, *W* indica que *W* debe ser igual a -1; es decir, la estructura es una superhélice negativa con una vuelta superhelicoidal.

Las dos estructuras descritas anteriormente, [$L = 9$, $T = 9$, $W = 0$] y [$L = 9$, $T = 10$, $W = -1$], tienen el mismo número de enlace y son interconvertibles sin rotura de ningún enlace fosfodiéster. La equivalencia potencial de estos dos tipos de estructuras se hace más patente cuando los extremos de los polinucleótidos de cada

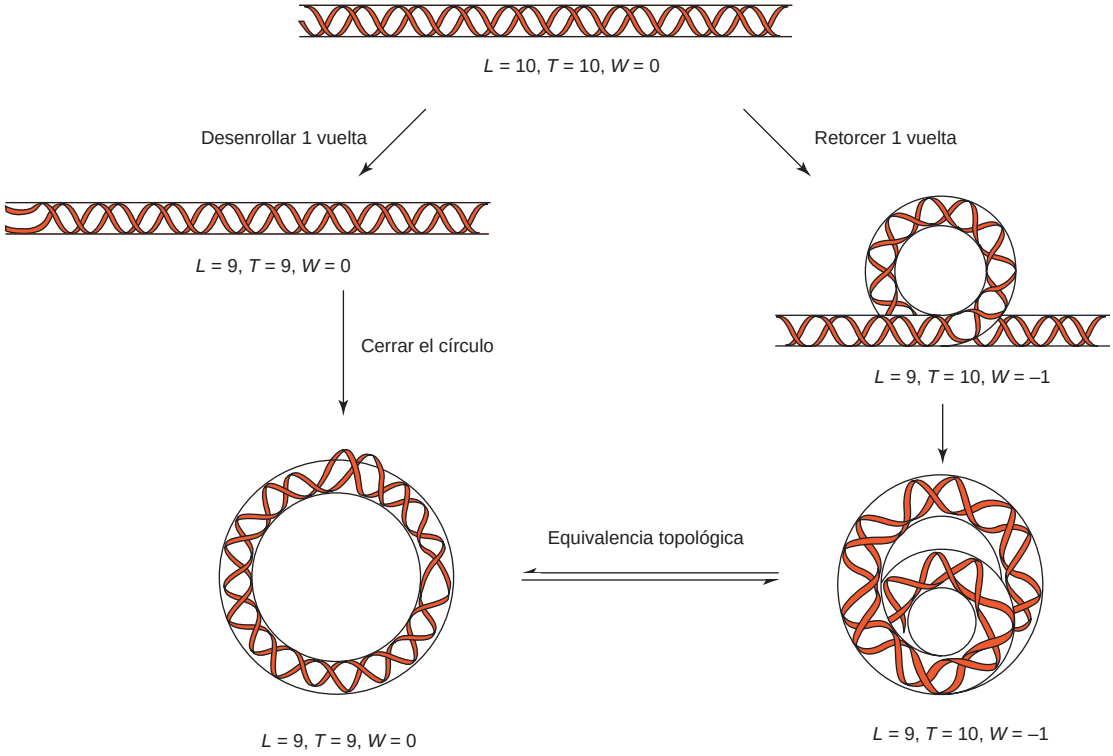


FIGURA 2.41
Relación entre torsión y retorcimiento
Puede hacerse una representación precisa de las estructuras superhelicoidales del DNA utilizando el número de vueltas de hélice, *T*, y el número de vueltas superhelicoidales o número de retorcimiento, *W*, junto con un tercer parámetro, el número de enlace, *L*, tal como se definen en el texto. La figura muestra distintas formas de introducir una vuelta superhelicoidal en un segmento de DNA con 10 vueltas del dúplex y los parámetros de las hélices resultantes.
Adaptado con aurtorización de Cantor, C. R. y Schimmel, P. R. Biophysical Chemistry, *Part III. San Francisco: Freeman, 1980. Copyright © 1980.*

estructura se unen para formar un círculo sin permitir que giren las hebras. La circularización produce una estructura circular entrelazada (una estructura en forma de número 8 conocida como hélice **plectonémica**) o una conformación superhelicoidal en forma de rosquilla conocida como vuelta **toroidal**, que son libremente interconvertibles. La vuelta entrelazada, que se muestra en la Figura 2.42, puede producirse desenrollando una vuelta toroidal a lo largo de un eje distinto del eje del superenrollamiento.

En el DNA superhelicoidal real hay un equilibrio entre muchas formas que tienen el mismo número de enlace, pero un número diferente de vueltas helicoidales y superhelicoidales. Aunque el número de enlace es un número entero constante, la torsión puede variar en incrementos positivos y negativos, que son compensados por

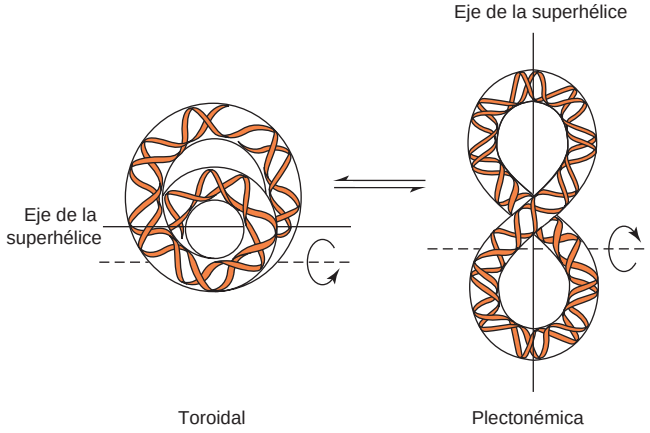


FIGURA 2.42
Equilibrio entre dos formas superenrolladas equivalentes de DNA.
Las formas mostradas son interconvertibles, bien desplegando la forma toroidal a lo largo de un eje paralelo al eje de la superhélice, bien plegando la forma entrelazada (plectonémica) en forma de 8 a lo largo de un eje perpendicular al eje de la superhélice. Las dos formas tienen los mismos números *W*, *T* y *L*.
Adaptado con aurtorización de Cantor, C. R. y Schimmel, P. R. Biophysical Chemistry, *Part III. San Francisco: Freeman, 1980. Copyright ©1980.*

cambios negativos y positivos en el retorcimiento. El desenrollamiento del DNA se distribuye entre una mezcla de vueltas superhelicoidales plectonémicas y toroidales y en la disminución de la torsión local en determinadas regiones de la doble hélice.

Aunque la forma circular cerrada del DNA es el arquetipo para la adquisición de una estructura superhelicoidal, cualquier segmento de DNA bicatenario con los extremos inmovilizados puede ser superhelicoidal. Por ejemplo, el DNA de las células eucarióticas puede adquirir forma superhelicoidal debido a que su anclaje a proteínas nucleares crea numerosos **dominios topológicos** cerrados. Un dominio topológico se define como un segmento de DNA contenido de tal forma que impida la rotación de la doble hélice. En general, la superhelicidad negativa es una propiedad importante, tanto si el DNA es circular como lineal. La superhelicidad contribuye al empaquetamiento del DNA en los límites de la célula, facilitando la formación de estructuras compactas. Por ejemplo, mientras que la longitud del DNA en cada cromosoma humano es del orden de centímetros, los cromosomas mitóticos condensados tienen una longitud de pocos nanómetros. La superhelicidad negativa también puede facilitar el proceso de separación local de las hebras del DNA durante los procesos de reparación, síntesis y recombinación.

Topoisomerasas

Las topoisomerasas regulan la formación de superhélices. Estos enzimas cambian el número de enlace, *L*, del DNA. Las topoisomerasas actúan catalizando la rotura y unión concertada de las hebras del DNA, produciendo así un DNA que puede ser más o menos superhelicoidal que el original. Las topoisomerasas se clasifican en las de tipo I, que rompen una sola hebra, y las de tipo II, que rompen las dos hebras al mismo tiempo. Las **topoisomerasas I** actúan realizando un corte transitorio en una de las hebras de un dúplex de DNA superenrollado, que cambia el número de enlace en incrementos de una unidad y que da como resultado la relajación del DNA superenrollado (Figura 2.43).

Las **topoisomerasas II** actúan fijándose a una molécula de DNA, de tal forma que se generan dos bucles superenrollados, tal como se muestra en el paso 1 de la Figura 2.44. Puesto que uno de los bucles es positivo y el otro negativo, y no hay rotura de enlaces fosfodiéster, el número de enlace del DNA no se modifica. A continuación, el enzima corta ambas hebras y pasa un segmento de DNA a través de la mella, antes de restablecer la continuidad de la hebra. Esta manipulación invierte el signo de la vuelta superhelicoidal positiva, de lo que resulta la introducción de dos vueltas superhelicoidales negativas y el cambio del número de enlace en incrementos de dos. La energía para la reacción de la topoisomerasa II procede de la hidrólisis del ATP, que se utiliza para restablecer la conformación del enzima. Las topoisomerasas permanecen unidas al DNA durante la reacción por un enlace covalente entre un residuo tirosilo y un grupo fosforilo en el lugar de la escisión (un enlace

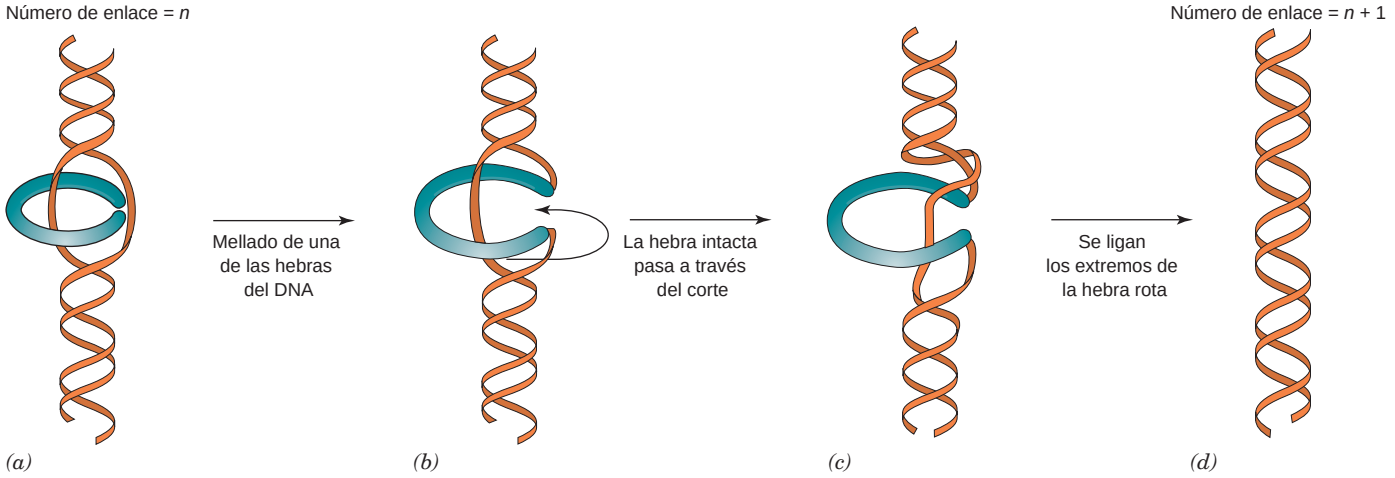


FIGURA 2.43
Mecanismo de acción de las topoisomerasas I.
Para relajar el DNA las topoisomerasas I (*a*) se unen al DNA y separan localmente las hebras complementarias; (*b*); a continuación, cortan una de las hebras y se unen a los extremos generados; (*c*) hacen pasar la hebra intacta a través del corte y, finalmente, restablecen el enlace fosfodiéster. El resultado es una estructura relajada (*d*).
Adaptado de Dean, F., Kaasnow, M. A., Otter, R., Matzuk, M. M. y Spengler, S. J. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *47:769, 1983.*

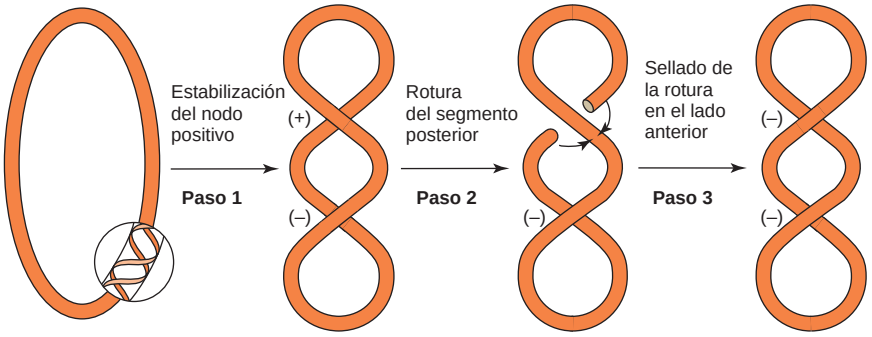
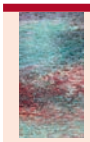


FIGURA 2.44
Mecanismo de acción de las topoisomerasas II. Las topoisomerasas II (y la girasa) cambian el número de enlace del DNA uniéndose a la molécula de DNA y pasando un segmento de DNA a través de un corte reversible formado en un segmento diferente de la misma molécula de DNA. El mecanismo de acción de la girasa se ilustra utilizando como ejemplo la conversión de una molécula de DNA relajado en una molécula que contiene dos superenrollamientos, uno positivo y otro negativo (primer paso). El paso de un segmento de DNA a través del superenrollamiento positivo mostrado en la parte derecha de la figura (tercer paso) cambia el número de enlace, dando lugar a una molécula que contiene dos superenrollamientos negativos.
Adaptado con permiso de Brown, P. O. y Cozzarelli, N. R. Science 206:1081, 1979. Copyright © 1979 by the American Association for the Advancement of Science.

5′-fosfotirosina). Este enlace enzima-polinucleótido conserva la energía del enlace fosfodiéster escindido para la subsiguiente reparación de la mella.

Un subgrupo de topoisomerasas de tipo II, las **girasas**, son los únicos enzimas que introducen vueltas superhelicoidales negativas en el DNA relajado. Estos enzimas son sólo bacterianos. No se ha encontrado ningún enzima análogo en eucariotas. Los eucariotas usan el enrollamiento del DNA alrededor de proteínas cromosómicas para introducir vueltas superhelicoidales negativas en el DNA relajado. La girasa introduce vueltas superhelicoidales negativas en el DNA a una velocidad de unas 100 por minuto. La regulación de la superhelicidad en la célula requiere la participación tanto de la actividad de la topoisomerasa II/girasa como de la topoisomerasa I. El equilibrio entre estas dos actividades enzimáticas opuestas determina el grado de superhelicidad del DNA celular. La relación entre el ATP y el ADP puede jugar un papel en este proceso, pues esta relación influye en la actividad de la girasa. Los compuestos que inhiben a las topoisomerasas y a las girasas también son efectivos agentes antibacterianos y antitumorales (véase la Apl. Clín. 2.7).



APLICACIÓN CLÍNICA 2.7
Uso de las topoisomerasas en el tratamiento de enfermedades

Las topoisomerasas se están convirtiendo en la diana de agentes antimicrobianos y antineoplásicos. Estos agentes tienen en común su mecanismo de acción principal, consistente en interferir el empalme catalizado enzimáticamente de hebras del DNA, inhibiendo uno de los dos pasos del mecanismo de acción de las topoisomerasas. Así, estos agentes no inhiben la actividad global del enzima, como es el caso de la mayoría de los agentes cuya diana es un enzima. En cambio, bloquean el complejo inicial entre la topoisomerasa y el DNA. Ello tiene como consecuencia la degradación del DNA, la introducción de mutaciones o la inhibición de la traducción y la replicación.

En el tratamiento del cáncer, tanto la topoisomerasa I como la II pueden ser dianas terapéuticas. La camptotecina y sus derivados modifican la función de la topoisomerasa I. Se ha observado una muy buena correlación entre la actividad antitumoral de varios derivados de la camptotecina en el tratamiento de la leucemia de ratón y la interferencia de la actividad de la topoisomerasa. Las camptotecinas pueden causar lesiones potencialmente letales en las celulas mediante la formación de complejos de corte del DNA estabilizados por estos agentes. La replicación posterior del DNA puede ser un prerrequisito para la citotoxicidad. Los altos niveles de topoisomerasa I que se encuentran en las fases avanzadas del cáncer de colon pueden contribuir a la eficacia terapéutica de dos derivados de la camptotecina. Los estudios con otros dos potentes agentes antineoplásicos (amsacrina y etopósido), que actúan selectivamente sobre la topoisomerasa II, indican que estos agentes de utilidad clínica estabilizan los complejos de corte topoisomerasa II–DNA, interfiriendo con la reacción enzimática de ligación del DNA. Existen pruebas indirectas de que estos agentes estimulan la formación de estos complejos. En contraste con las observaciones que subrayan la importancia de la replicación del DNA para la manifestación del efecto citotóxico de los agentes que actúan sobre la topoisomerasa I, los cortes del DNA mediados por la topoisomerasa II pueden ejercer el efecto citotóxico en ausencia de replicación del DNA. En este caso, las lesiones letales inducidas por los agentes contra la topoisomerasa II podrían depender de la existencia de recombinación y de mutaciones en los sitios de formación de los complejos topoisomerasa II–DNA inducidos por estos agentes. Muchos agentes anticancerígenos tales como las antraciclinas (incluidas la adriamicina y la doxorrubicina), los intercalantes sintéticos, las elipticinas y las podofilotoxinas, ejercen su efecto terapeútico sobre la topoisomerasa II. Las neoplasias hematológicas como las leucemias linfocitarias y no linfocitarias, linfomas no-Hodgkin de alto grado y la enfermedad de Hodgkin se tratan principalmente con combinaciones de uno o más inhibidores de la topoisomerasa II en presencia o ausencia de agentes citotóxicos adicionales.

Algunos inhibidores de las topoisomerasas también son potentes agentes antibacterianos. Las quinolonas constituyen un numeroso grupo de antibióticos que inhiben selectivamente la girasa y/o la topoisomerasa IV. Algunos antibióticos comunes de esta clase son el ácido nalidíxico y la norfloxacina. Estos antibióticos se unen a los complejos girasa-DNA, atrapando un intermediario. Puesto que estos enzimas son exclusivos de las bacterias, estos agentes muestran una gran selectividad en su acción citotóxica. Los antibióticos del grupo de la quinolonas muestran generalmente una mayor actividad sobre las bacterias gram-negativas tales como las *Enterobateriaceae*, *Neisseria* y *Haemophilus*, pero análogos desarrollados recientemente muestran actividad mejorada contra bacterias gram-positivas y anaeróbicas.

Potmesil, M. y Kohn, K. W. (Eds.). *DNA Topoisomerases in Cancer.* New York: Oxford University Press, 1991; y Hooper, D. C. Clinical applications of quinolones. *Biochem. Biophys. Acta* 1400:45, 1998.

TABLA 2.4 Propiedades de las DNA topoisomerasas.

Enzima	*Tipo*[a]	*ΔL*	*Actividades*
Topoisomerasa I de *E. coli* (*top A*)[b]	I	Incrementa *L* $\Delta L = 1$	Relaja DNA superenrollado negativamente
Topoisomerasa I eucariótica de levaduras (*top 1*)	I	Incrementa o disminuye *L* $\Delta L = \pm 1$	Relaja DNA superenrollado positiva o negativamente
Topoisomerasa II de *E. coli* o *DNA II* girasa (*gyrA*, *gyrB*)	II	Incrementa o disminuye *L* $\Delta L = \pm 2$	Introduce superenrollamiento negativo en el DNA; relaja DNA superenrollado positiva o negativamente
Topoisomerasa IV de *E. coli* (*parC*, *parE*)	II	Incrementa *L* $\Delta L = +2$	Relaja el DNA; no puede introducir superenrollamiento negativo
Topoisomerasa II eucariótica de levaduras (*top 2*)	II	Incrementa o disminuye *L* $\Delta L = \pm 2$	Relaja DNA superenrollado positiva o negativamente
Topoisomerasa III de *E. coli* (*top B*)	I	Incrementa *L* $\Delta L = +1$	Relaja DNA superenrollado negativamente. Deshace nudos en el DNA
Topoisomerasa III eucariótica (*top 3*)	I	Incrementa *L* $\Delta L = +1$	Actividad específica en DNA con heterodúplex de cadena sencilla

[a] Las topoisomerasas tipo I utilizan Mg^{2+} como cofactor pero no ATP. Las topoisomerasas tipo II requieren Mg^{2+} y ATP.
[b] Entre paréntesis se indica el nombre del gen que codifica la topoisomerasa.

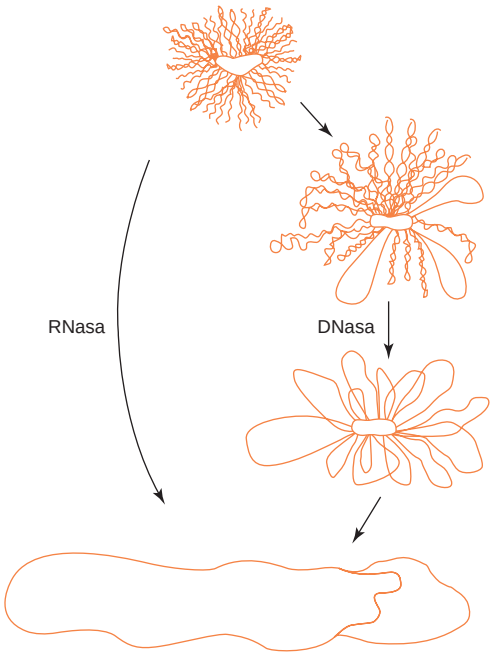


FIGURA 2.45
Los cromosomas bacterianos están empaquetados en nucleoides.
El cromosoma circular de una bacteria está compactado formando 40-50 bucles de DNA superenrollado, organizados por un centro de anclaje de RNA y proteína. La DNasa relaja progresivamente la estructura, abriendo los bucles individuales, de uno en uno. La RNasa desorganiza el centro del nucleoide y despliega completamente el cromosoma en un único paso.
Adaptado de Worcel, A. y Burgi, E. J. Mol. Biol. *71:127, 1972.*

Las topoisomerasas también catalizan otras isomerizaciones topológicas (Tabla 2.4). Las topoisomerasas bacterianas del tipo III poseen propiedades similares a las topoisomerasas de tipo I; es decir, pueden relajar vueltas superhelicoidales sin necesidad de una fuente de energía, tal como la hidrólisis del ATP. Estas topoisomerasas pueden estar especializadas en la resolución de los productos encadenados de DNA circular (eslabonados) que se generan justo antes de que se complete la replicación del DNA. Una clase poco usual de topoisomerasas, las **girasas inversas**, se han aislado de varias especies de arquebacterias. Estos enzimas tienen la notable propiedad de introducir vueltas superhelicoidales positivas en el DNA. El superenrollamiento positivo podría proteger el DNA de las condiciones desnaturalizantes de alta temperatura y acidez del hábitat de estas bacterias.

Empaquetamiento del DNA procariótico

En las células procarióticas el DNA forma un solo cromosoma circular superespiralado bicatenario. En una bacteria común como *E. coli*, la longitud de contorno del DNA es unas 80 veces más larga que el diámetro de la célula. Por lo tanto, el DNA debe estar empaquetado de forma muy condensada para caber en el interior de la célula. Los cromosomas bacterianos están organizados en estructuras compactas, llamadas **nucleoides**, resultantes de la interacción de las proteína **HU** y **H-NS**, con la participación de varios cationes, **poliaminas** (tales como la espermina, la espermidina, la putrescina y la cadaverina), RNA y proteínas no histonas (Figura 2.45). HU (masa molecular 18 kDa) forma un heterodímero de dos subunidades casi idénticas (HU-1 y HU-2). Al unirse al DNA, HU cambia la forma y la superhelicidad de la doble hélice. *In vitro*, HU compacta el DNA e influye en la superhelicidad de forma dependiente de la concentración. A una relación equimolecular, la interacción del DNA con HU impide que las topoisomerasas relajen el DNA superespiralado negativamente en el complejo DNA-HU. HU también puede producir el superenrollamiento del DNA relajado. Concentraciones superiores de HU no estabilizan un número superior de vueltas superhelicoidades. Los efectos de HU sobre la superespiralación del DNA, junto con otros datos experimentales, muestran que HU puede introducir curvas cerradas en el DNA. HU es el principal responsable de la estructura en cuentas del nucleoide de los procariotas. H-NS, otra proteína pequeña y abundante, puede estar implicada en la organización del cromosoma, directa o indirectamente, a través de la interacción con HU. En *E. coli*, el nucleoide consiste en una única molécula de DNA superespiralado, organizado en unos 40 lazos, cada uno con aproximadamente 10^5 pb de DNA, unidos a un andamio rico en proteínas y RNA. En los andamios procarióticos los lazos se mantienen por interacciones entre DNA y RNA, en lugar de sólo interacciones DNA-proteína, tal como sucede en los eucariotas. Gracias a la formación de los nucleoides, que tienen diámetros de

2 μm, el genoma de *E. coli* puede acomodarse fácilmente en la célula. Los cromosomas bacterianos son estructuras dinámicas, que se fijan y disocian bastante rápidamente. Ello puede ser el reflejo de la rapidez de los procesos de síntesis de DNA, división celular y transcripción característica de estas células.

Organización de la cromatina eucariótica

En las células eucarióticas el DNA se encuentra asociado a varias proteínas para formar la **cromatina**. En células que no se dividen (interfase), la cromatina tiene apariencia amorfa y se encuentra dispersa por el núcleo. Justo antes de la división celular (metafase), la cromatina se organiza en estructuras compactas llamadas **cromosomas**. Cada cromosoma posee un **centrómero**, que constituye el lugar de anclaje para las proteínas que unen el cromosoma al huso mitótico. Los **telómeros** son los extremos de los cromosomas lineales. Los cromosomas también contienen las secuencias necesarias para el inicio de la replicación del DNA (**origen de replicación**).

La enorme longitud del genoma de la mayoría de los eucariotas hace necesaria la división de la información genética en numerosos dominios independientes; esto es, los cromosomas. El número de cromosomas es característico de cada especie; las células humanas contienen 46 cromosomas (cromátidas) distribuidos en 23 pares. La longitud promedio del DNA de los cromosomas es de $1{,}3 \times 10^8$ pb o, aproximadamente, 5 cm. Cada uno de los cromosomas humanos contiene una única molécula de DNA intacta que puede variar en tamaño desde los 263×10^6 pb del cromosoma 1 hasta menos de 50×10^6 pb del cromosoma 23. La organización de los cromosomas, que posibilita que el DNA pueda alojarse dentro de un núcleo celular con un diámetro de aproximadamente 10 μm, requiere una "razón de condensación" de más de cinco órdenes de magnitud. Durante la metafase, la molécula de DNA está estrechamente empaquetada. Por ejemplo, el cromosoma humano 16 tiene 2,5 μm de largo, mientras que el DNA de cada una de las dos cromátidas tiene 3,7 cm, lo que da una razón de condensación de $1{,}5 \times 10^4 : 1$. La distribución del DNA nuclear en 46 cromosomas aumenta la razón de condensación hasta 105:1.

Los primeros niveles de empaquetamiento del DNA que conducen a la formación de **fibras de 30 nm** se han estudiado extensamente. Más escasos son los conocimientos sobre los niveles superiores de condensación del DNA, en los cuales se organizan dominios en forma de bucle de la fibra de 30 nm mediante andamios y enrollamientos de la cromátida . En cada nivel de empaquetamiento, mostrado en este modelo, el DNA se condensa varias veces (Figura 2.46). El efecto acumulativo de los sucesivos niveles de plegamiento proporciona la elevada relación de condensación necesaria para el empaquetamiento del DNA en el núcleo. La primera fase de organización es la formación de la estructura en "collar de cuentas", que consiste en la unión del DNA con unas proteínas muy básicas conocidas como **his-**

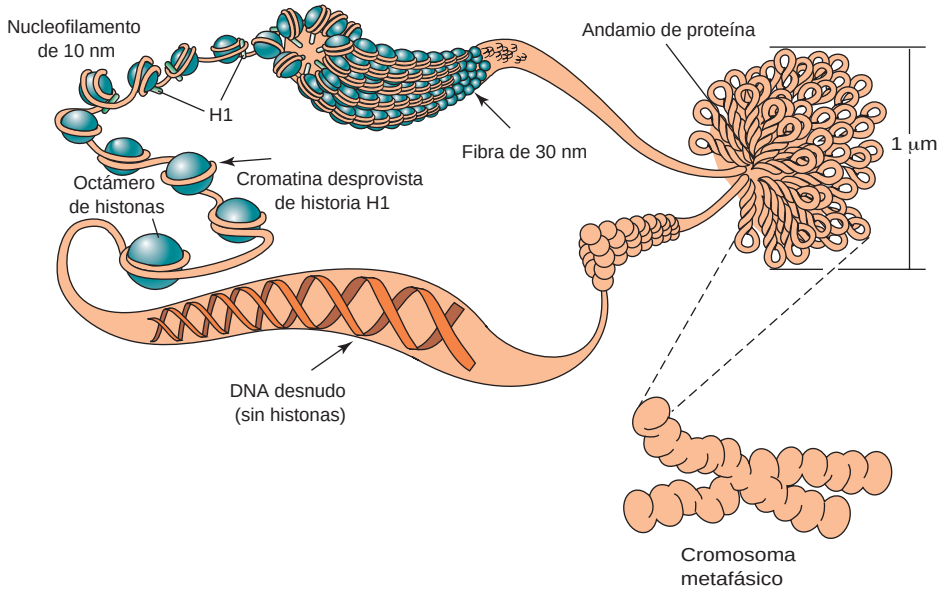


FIGURA 2.46
Organización del DNA en los cromosomas. Esquema hipotético de la condensación progresiva del DNA en la cromatina. El DNA se enrolla inicialmente alrededor de las histonas en los nucleosomas. La condensación con histona H1 produce el filamento de 10 nm, que se pliega ulteriormente en una estructura retorcida y con bucles, unida al andamiaje de proteínas del cromosoma.

tonas. Estas proteínas interaccionan fuertemente con el DNA, formando complejos muy estables. La disposición en "collar de cuentas" se observa cuando la cromatina se somete a condiciones de baja fuerza iónica y se examina al microscopio electrónico. Las "cuentas", formadas por DNA enrollado sobre las histonas, están conectadas por DNA libre.

Las histonas consisten, independientemente de su procedencia, en cinco tipos de polipéptidos de diferente tamaño y composición. Las histonas más "conservadas" son la **H4** y la **H3**, que presentan pocas diferencias, incluso entre especies muy alejadas; las H4 de vaca y de guisante son muy similares, sólo difieren en dos aminoácidos, a pesar de que estas especies divergieron hace más de mil millones de años. Las **H2A** y **H2B** están menos conservadas, pero también muestran una gran estabilidad evolutiva, especialmente en sus regiones no básicas. La **H1** es muy diferente de las otras histonas; es más grande, más básica y, con mucho, la que muestra una mayor especificidad de tejido y de especie. Los vertebrados contienen una histona adicional, la **H5,** que tiene una función similar a la de la H1. Como resultado de su anormalmente elevado contenido en los aminoácidos básicos lisina y arginina, las histonas son altamente policatiónicas e interaccionan con el esqueleto polianiónico de fosfatos del DNA dando lugar a nucleoproteínas sin carga. Las cinco histonas se caracterizan por un dominio central no polar, de estructura globular, y unas regiones N-terminales y C-terminales que contienen la mayor parte de los aminoácidos básicos. Las regiones N-terminales básicas de H2A, H2B, H3 y H4 constituyen los sitios principales de interacción con el DNA. Un grupo heterogéneo de proteínas con elevada especificidad de especie y de órgano también está presente en la cromatina. Estas proteínas, que se agrupan bajo el nombre de proteínas no histonas, constituyen un grupo de varios centenares de proteínas diferentes que se encuentran, en su mayor parte, en cantidades muy pequeñas. Muchas proteínas no histonas están asociadas con diversas funciones cromosómicas tales como la replicación, la expresión génica y la organización del cromosoma.

Nucleosomas y polinucleosomas

Las histonas interaccionan con el DNA y forman una estructura periódica en "collar de cuentas" llamada polinucleosoma, en la que la unidad elemental, el **nucleosoma**, se repite regularmente (Figura 2.47). Cada nucleosoma es una estructura en forma de disco de aproximadamente 11 nm de diámetro y 6 nm de altura, que consiste en un fragmento de DNA y un núcleo octamérico de histonas, compuesto por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Cada agregado de histonas consiste en un tetrámero $(H3)_2$-$(H4)_2$ con un dímero H2A-H2B apilado sobre cada una de las caras del disco. El DNA se enrolla alrededor del octámero en forma de superhélice toroidal negativa; el núcleo central de $(H3)_2$-$(H4)_2$ interacciona con los 70–80 pares de bases centrales del DNA (Figura 2.48). Las histonas están en contacto con el surco menor del DNA, y dejan libre el surco mayor para interacciones con proteínas que regulan la expresión génica y otras funciones del DNA.

La estructura del nucleosoma explica por qué las células eucarióticas carecen de topoisomerasas que puedan desenroscar el DNA. En las células eucarióticas, la superhelicidad negativa resulta del enrollamiento toroidal del DNA alrededor de las histonas (Figura 2.49). Este enrollamiento implica la eliminación de aproximadamente una vuelta helicoidal en el DNA, lo cual genera una vuelta superhelicoidal negativa en la región enrollada en torno a las histonas y una vuelta superhelicoidal positiva compensatoria en otro lugar de la molécula, con objeto de mantener constante el número de enlace. La subsiguiente relajación del superenrollamiento positivo por las topoisomerasas eucarióticas deja una vuelta superhelicoidal negativa neta en la región del nucleosoma.

Los nucleosomas consisten en aproximadamente 146 pb de DNA enrollado en torno del octámero de histonas. Los polinucleosomas consisten en numerosos nucleosomas unidos por el **DNA "de unión"**, de unos 20–90 pb de longitud. Este DNA está asociado con la histona H1 que fija el DNA en su sitio; el complejo resultante se denomina **cromatosoma** (Figura 2.48). La periodicidad de la distribución de los nucleosomas a lo largo de los polinucleosomas se ha determinado por digestión controlada con nucleasas, que cortan preferentemente el DNA de unión. La distribución de los nucleosomas no es aleatoria en relación con la secuencia de bases del DNA. La curvatura del DNA en el nucleosoma no es uniforme: se encuentran zonas de curvatura más suave y otras de curvatura más cerrada alrededor del octámero de histo-

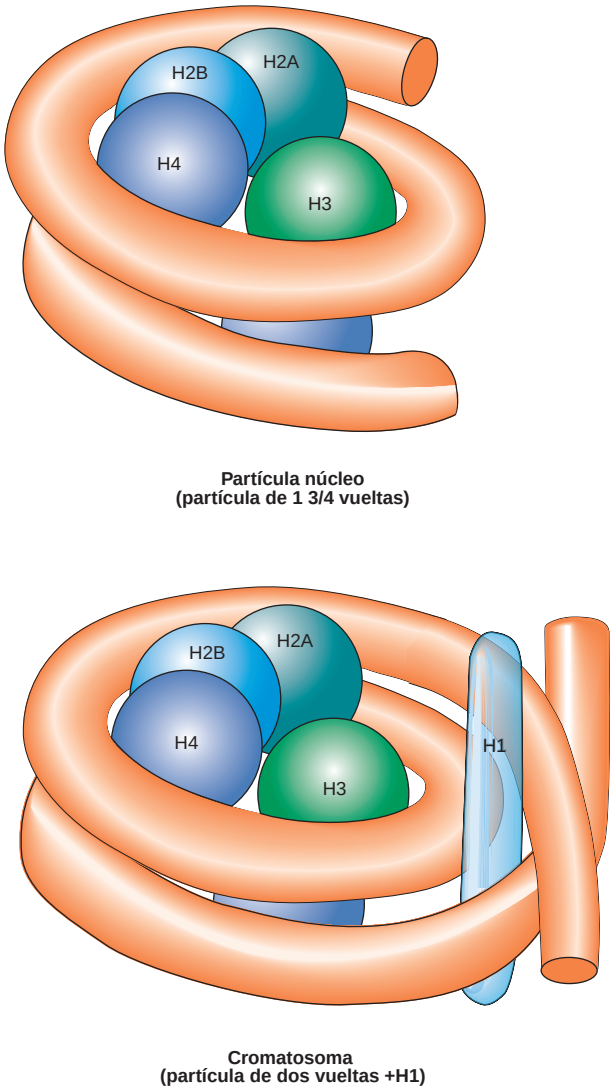


FIGURA 2.47
Modelos de la estructura del nucleosoma.
La partícula núcleo del nucleosoma consiste en aproximadamente 146 pares de bases de DNA correspondientes a $1\frac{3}{4}$ vueltas superhelicoidales enrolladas alrededor de un octámero de histonas. El cromatosoma consiste en unos 166 pares de bases de DNA (dos vueltas superhelicoidales). Esta partícula incorpora la histona H1, que está asociada con el DNA de unión.

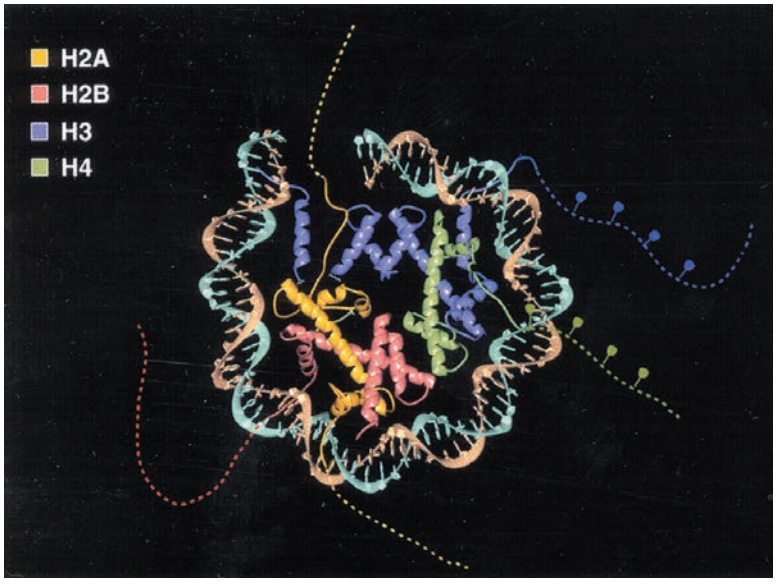


FIGURA 2.48
Estructura por difracción de rayos X de la partícula núcleo del nucleosoma.
El disco del nucleosoma se ha cortado por la mitad para mostrar una vuelta de DNA enrollada alrededor de cuatro moléculas de histona. Las líneas de puntos representan partes no estructuradas de las colas de las histonas.
Reproducido de Kornberg, R. D. y Lorch, Y. Cell *98:285, 1999,* con autorización de Elsevier Science.

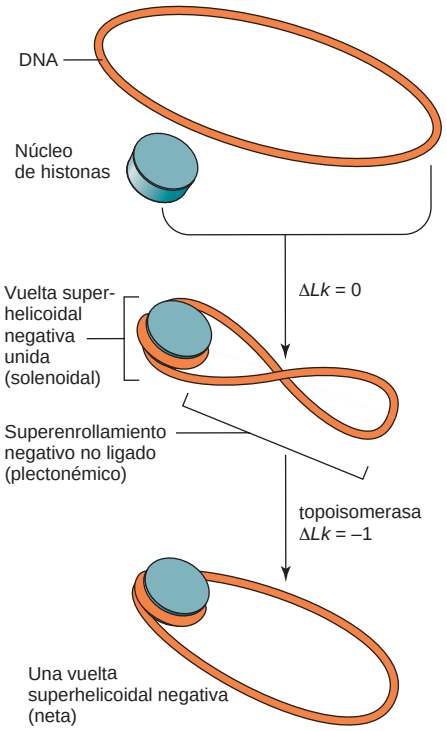


FIGURA 2.49
Generación de superhelicidad negativa en el DNA eucariótico.
La unión de un octámero de histonas a un dominio de DNA cerrado y relajado obliga al DNA a enrollarse alrededor del octámero, lo que genera un superenrollamiento negativo. Si no se produce una mella en alguna de las cadenas y el dominio permanece intacto, es necesario que en algún otro lugar del dominio se genere un superenrollamiento positivo compensatorio. La acción de las topoisomerasas eucarióticas de tipo I relaja posteriormente el superenrollamiento positivo y da lugar a un dominio cerrado con una vuelta superhelicoidal negativa neta.

nas. Ello sugiere que la unión del DNA depende de la secuencia y que el posicionamiento de los nucleosomas puede estar influido por la secuencia del DNA. De hecho, los nucleosomas tienden a asociarse preferentemente con ciertas regiones del DNA. Los segmentos largos de A o las repeticiones de G-C normalmente no forman nucleosomas. En cambio, ciertas regiones de DNA curvado, por ejemplo segmentos de A repetidos periódicamente, interaccionan fuertemente con las histonas. Los nucleosmas migran a lo largo del DNA. Esta movilidad permite a las DNA polimerasas y otros enzimas necesarios para la replicación y la trascripción acceder hasta el DNA.

Empaquetamiento de los polinucleosomas en estructuras de orden superior

El enrollamiento del DNA alrededor de las histonas para formar nucleosomas reduce 10 veces la longitud aparente del DNA. Esto da lugar a la denominada **fibra de 10 nm** (en realidad tiene 11 nm de ancho), que es el diámetro de los nucleosomas. En los cromosomas aislados mediante métodos muy suaves pueden observarse al microscopio electrónico tanto las fibras de 10 nm como fibras más gruesas de 30 nm (en realidad de 34 nm). Las **fibras de 30 nm** pueden transformarse en fibras de 10 nm mediante tratamiento con disoluciones de baja fuerza iónica. Parece que las fibras de 30 nm son el resultado de la condensación de la fibra de 10 nm en un solenoide con seis o siete cromatosomas por vuelta (Figura 2.50). Es posible que las moléculas de histona H1 adyacentes interaccionen unas con otras de manera cooperativa, aproximando así los nucleosomas en la fibra de 30 nm. La formación de los polinucleosomas y su posterior condensación en la fibra de 30 nm da lugar a una relación de empaquetamiento del DNA de hasta dos órdenes de magnitud. Las fibras de 30 nm sólo se forman en regiones del DNA caracterizadas por la ausencia de interacciones con proteínas no histonas de unión al DNA con especificidad de secuencia. La presencia de proteínas de unión al DNA y su efecto sobre la formación de fibras de 30 nm puede depender del estatus transcripcional de las correspondientes regiones del DNA.

Los modelos de los niveles superiores de empaquetamiento de la fibra de 30 nm se basan en pruebas indirectas obtenidas del estudio de dos tipos de cromosomas especializados: los **cromosomas plumulados** de los oocitos de vertebrados y los **cromosomas politénicos** de las células secretoras gigantes de la mosca del vinagre. Estos cromosomas son excepcionales dado que mantienen estructuras precisas de orden superior durante la interfase, es decir cuando las células no se dividen. La extrapolación de las características estructurales de los cromosomas plumulados interfásicos ha llevado a proponer que los cromosomas, en general, se organizan en

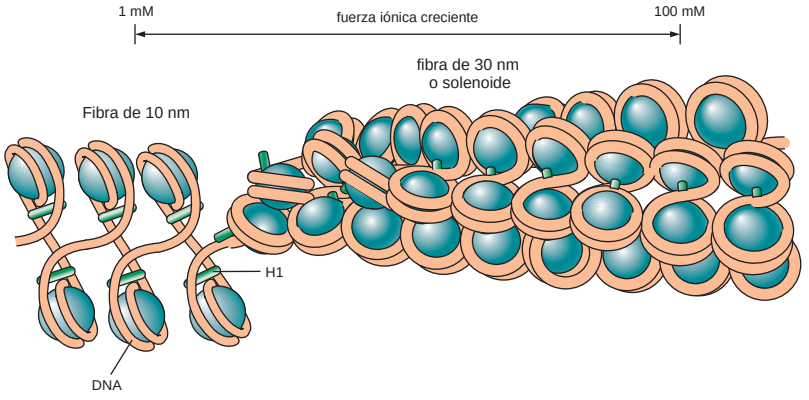


FIGURA 2.50
Estructura del nucleofilamento.
La cadena extendida de polinucleosomas, o nucleofilamento, tiene la apariencia de un "collar de cuentas". La historia H1 se une a las regiones de "unión" entre los nucleosomas, pero en la estructura resultante, las moléculas de H1, asociadas a nucleosomas adyacentes, se encuentran una junto a otra. A concentraciones salinas más elevadas, los polinucleosomas se transforman en la estructura de orden superior de la fibra de 30 nm. Se ha especulado que, a fuerzas iónicas más elevadas, el nucleofilamento forma una estructura en solenoide muy compacta, tal como se ilustra en la parte superior de la figura. En esta estructura las histonas H1 pueden interaccionar fuertemente entre sí. De hecho, la organización del nucleofilamento de 10 nm en la espiral o solenoide de 30 nm requiere la presencia de H1.
Adaptado de Kornberg, R. D. y Klug, A. The Nucleosome. *San Diego, CA: Academic Press, 1989.*

una serie de dominios condensados de la fibra de 30 nm en forma de bucles de tamaño variable según los organismos. Estos bucles podrían contener entre 5000 y 120 000 pb, con un promedio de 20 000 pb. Así, el genoma haploide humano podría contener alrededor de 60 000 bucles, cifra próxima al número estimado de genes (30 000-60 000). Es probable que cada bucle contenga uno o unos pocos genes ligados. Los dominios están anclados a un andamio nuclear compuesto por histona H1 y otras proteínas no histonas, que incluyen las dos proteínas de andamio más importantes, Scl (una topoisomerasa del tipo II) y Sc2. Los bucles están fijados por sus bases y, por tanto, pueden acumular superenrollamientos. Regiones específicas ricas en AT, conocidas como **SAR** (del inglés *scaffold attachment regions*, **regiones de anclaje al andamio**), se encuentran preferentemente asociadas al andamio. Las SAR también contienen lugares de unión para la topoisomerasa II. La presencia de una topoisomerasa de tipo II en la base de los dominios topológicamente cerrados, que definen los bucles del andamio, sugiere que los cambios del superenrollamiento de estos dominios son biológicamente importantes. La formación de estos dominios en forma de bucle condensa la longitud del DNA 200 veces más, haciendo que la relación de empaquetamiento global ascienda a más de cuatro órdenes de magnitud. Cada bucle puede ser enrollado y superenrollado hasta un grosor de 0,4 μm, partiendo de una fibra de 30 nm. Puesto que el grosor de una cromátida es de aproximadamente 1 μm de diámetro, el empaquetamiento de la fibra de 30 nm en una cromátida requeriría tan sólo un orden más de plegamiento.

El siguiente nivel de organización cromosómica probablemente consiste en el empaquetamiento de los bucles. El empaquetamiento podría conseguirse disponiendo los bucles de la fibra de 30 nm en forma de enrollamientos helicoidales estrechamente apilados. Las **cromátidas** de los cromosomas metafásicos podrían consistir en bucles de la fibra de 30 nm empaquetados helicoidalmente. Los cambios en el empaquetamiento y, por tanto, la transición entre las diferentes formas de cromatina parecen estar controlados en parte por modificaciones covalentes en las histonas internas. Las histonas H3 y H4 pueden experimentar una acetilación reversible dependiente del ciclo celular en el grupo ε-amino de una lisina mediante dos enzimas diferentes, una histona acetilasa y una histona desacilasa. La acetilación parece afectar a la tensión superhelicoidal negativa dentro de los dominios y, en ciertos casos, a la unión de factores de transcripción. El grupo hidroxilo de la serina N-terminal de la histona H4 puede ser fosforilado por una quinasa. La acetilación y la fosforilación cambian la carga de la región N-terminal de la histona H4 de $+5$ a -2. La carga negativa resultante de las histonas hace que éstas se unan menos fuertemente al DNA, promoviendo el desplegamiento de la fibra de 30 nm y la descondensación de la cromatina. Finalmente, la fosforilación de la histona H1 está relacionada con la condensación de la cromatina para dar cromosomas metafásicos. Ello podría ser el resultado de la modulación de la interacción entre H1 fosforilada–desfosforilada y el octámero de histonas. El cambio de cromatina compacta a descondensada también está promovido por la unión de proteínas, conocidas como proteínas HMG (proteínas del grupo de alta movilidad), que interaccionan preferentemente con cromatina descondensada transcripcionalmente activa, esto es, la fibra de 10 nm. El control de la replicación y la transcripción en los eucariotas implica tanto a las proteínas histonas como a las no histonas. Mientras que la disociación de las histonas del DNA cromosómico puede ser un prerrequisito para la transcripción, las proteínas no histonas proporcionan controles de la transcripción más especializados. Cualesquiera que sean los detalles de los mecanismos de control, las regiones de DNA cromosómico que están sintetizando RNA de manera activa están menos condensadas que las regiones inactivas. Los genes activos han de estar empaquetados de tal manera que sean accesibles a las proteínas reguladoras, mientras que los genes reprimidos permanentemente deben permanecer inaccesibles. El empaquetamiento también puede determinar la accesibilidad del DNA a los agentes que pueden dañarlo. Finalmente, las proteínas no histonas controlan la expresión génica durante la diferenciación y el desarrollo y podrían ser los sitios de unión de hormonas y otras moléculas reguladoras.

2.5 SECUENCIA Y FUNCIÓN DEL DNA

El tamaño y la composición en bases promedio del DNA varían mucho según la especie. La propiedad que confiere carácter único al DNA de una especie es su se-

cuencia nucleotídica. Hasta hace poco la determinación directa de las secuencias de nucleótidos de un DNA genómico era una empresa intimidante. La tecnología desarrollada para el Proyecto Genoma Humano ha acelerado la velocidad de obtención de las secuencias de DNA. Muy pronto las secuencias completas de varias especies estarán disponibles para ser analizadas.

Endonucleasas de restricción y palíndromos

El descubrimiento de las **endonucleasas de restricción** fue clave para el desarrollo de los métodos de secuenciación del DNA genómico. Estos enzimas cortan el DNA de doble cadena en una secuencia específica, mediante dos cortes, uno en cada cadena (Figura 2.51). Las bacterias desarrollaron los enzimas de restricción como una defensa frente a la infección por fagos. El corte expone el DNA vírico a la degradación por exonucleasas bacterianas inespecíficas. El DNA bacteriano puede protegerse del corte por metilación específica de secuencia. Los sitios de reconocimiento de las metilasas de restricción corresponden a los de las endonucleasas. La metilación de bases específicas dentro del sitio de reconocimiento impide el corte por la correspondiente nucleasa. Los sitios más comunes para la metilación son la posición 5 de la citosina y el grupo 6-NH_2 de la adenina. Es de destacar que la metilación de bases tiene un papel fundamental en la regulación génica en los organismos superiores.

Se han purificado varios centenares de endonucleasas de restricción, y la lista sigue incrementándose. Con pocas excepciones, estos enzimas reconocen secuencias de cuatro a seis nucleótidos de longitud. Las pocas endonucleasas con lugares de reconocimiento más largos son útiles porque su frecuencia de corte de grandes DNA, como el de los cromosomas eucarióticos, es relativamente baja. Por ejemplo, Not I tiene una secuencia de reconocimiento de ocho nucleótidos. Las secuencias de reconocimiento son repeticiones invertidas perfectamente simétricas conocidas como **palíndromos**. El orden de las bases es el mismo cuando las dos hebras complementarias del palíndromo se leen ambas en dirección 5′ → 3′. Por ejemplo, en el caso del enzima de restricción EcoRI, aislado de *E. coli*, la secuencia de bases es 5′-GAATTC-3′. Las endonucleasas de restricción se clasifican en tres categorías. Los enzimas de Tipo I y III cortan en sitios alejados del sitio de reconocimiento. Los enzimas de Tipo II, cortan específicamente el DNA dentro de la secuencia de reconocimiento.

Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas que están presentes a lo largo de los grandes segmentos de DNA con frecuencias relativamente bajas, y fragmentan el DNA de manera muy selectiva. Por ejemplo, un DNA bacteriano típico, que contenga aproximadamente 3×10^6 pb, será cortado en unos pocos centenares de fragmentos. Un pequeño virus o un plásmido puede tener unos pocos o incluso ningún sitio de corte para una determinada endonucleasa de restricción (Figura 2.52). El significado práctico es que un enzima de restricción particular genera una única familia de fragmentos para una molécula de DNA dada, conocida como patrón de restricción. La disponibilidad de enzimas de restricción para cortar grandes secuencias de DNA y el desarrollo de técnicas electroforéticas para separar fragmentos de DNA ha hecho de la secuenciación una operación sencilla. Estas técnicas de secuenciación se describen en el Capítulo 7.

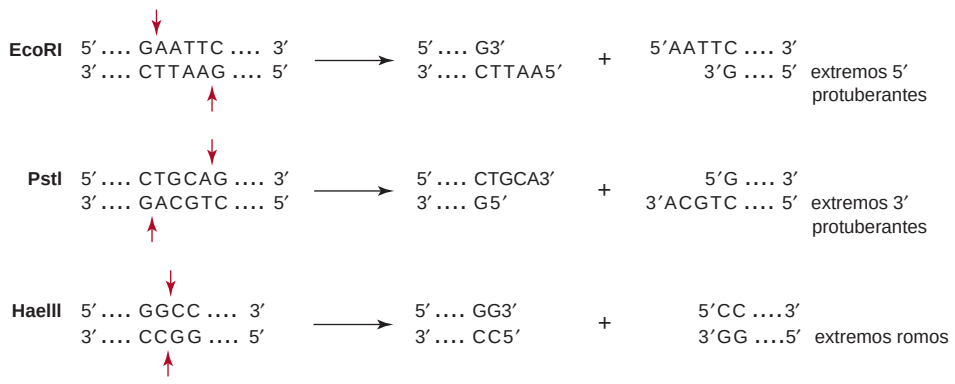


FIGURA 2.51
Tipos de productos generados por las endonucleasas de restricción del tipo II. Los enzimas, ejemplificados por EcoRI y PstI, producen mellas a ambos lados del centro de simetría del palíndromo, generando extremos monohebra protuberantes. Muchos enzimas de uso común generan extremos 5′ protuberantes, aunque algunos de ellos producen extremos 3′ protuberantes, como se aprecia en el caso de PstI. Otras nucleasas de restricción cortan a través del centro de simetría de la secuencia de reconocimiento, produciendo extremos romos, como en el caso de HaeIII.

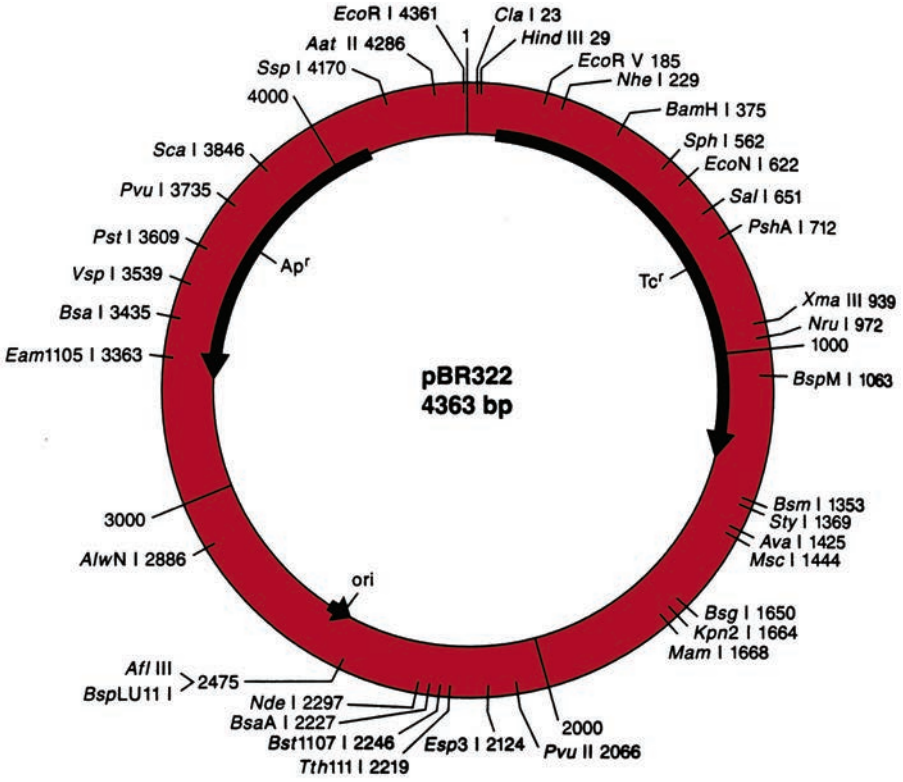


FIGURA 2.52
Mapa de restricción de un DNA de plásmido.
El plásmido bacteriano pBR322 es un DNA circular de 4363 pb que contiene genes de resistencia a los antibióticos ampicilina (Ap^r) y tetraciclina (Tc^r). En el mapa se indica la situación de las secuencias reconocidas por una serie de endonucleasas de restricción y que no están repetidas. Otras endonucleasas conocidas o bien cortan el plásmido en varios lugares o bien no lo cortan. Por ejemplo, la secuencia de restricción del enzima Bg 1I se encuentra repetida tres veces en el plásmido, mientras que Bg 1II no lo corta en absoluto.

La mayor parte del DNA procariótico codifica proteínas específicas

En los procariotas, un elevado porcentaje del DNA cromosómico total codifica proteínas específicas. El genoma de *E. coli*, que se ha secuenciado completamente, consiste en unos $4{,}6 \times 10^6$ pb de DNA y contiene ~4200 genes. No todos los genes codifican proteínas expresables o funcionales. Por ejemplo, ochenta genes codifican moléculas de tRNA y algunos posiblemente no codifican moléculas funcionales. En general, la información genética está densamente empaquetada en el DNA de *E. coli* y hay muy pocas repeticiones en la información que contiene el genoma. Tan solo el 1% del genoma de *E. coli* contiene múltiples copias de cortas secuencias repetitivas conocidas como **elementos palindrómicos extragénicos repetidos (REP)**. Los elementos REP están presentes en sitios de interacción del DNA con proteínas funcionales; por ejemplo, en la región de iniciación de la síntesis del DNA (denominada **OriC**). En OriC, elementos REP con una secuencia consenso de 34 nucleótidos sirven de sitios de unión de la topoisomerasa II. Elementos REP con la secuencia GCTGGTGG (sitios Chi) interaccionarían con el enzima RecBCD, que inicia la recombinación del DNA. Los sitios Chi se encuentran espaciados regularmente a intervalos separados por unos 4000 pb. La información genética se halla todavía más densamente organizada en organismos más pequeños tales como los bacteriófagos, en los que la secuencia primaria de DNA pone de manifiesto que los genes estructurales —secuencias de nucleótidos que codifican proteínas— no siempre tienen localizaciones físicas definidas. A veces pueden solaparse unos con otros, como muestra la secuencia parcial del bacteriófago **ϕX174** (Figura 2.53). El solapamiento contribuye al uso eficiente y económico de la limitada cantidad de DNA disponible y también podría controlar el orden de expresión de los genes.

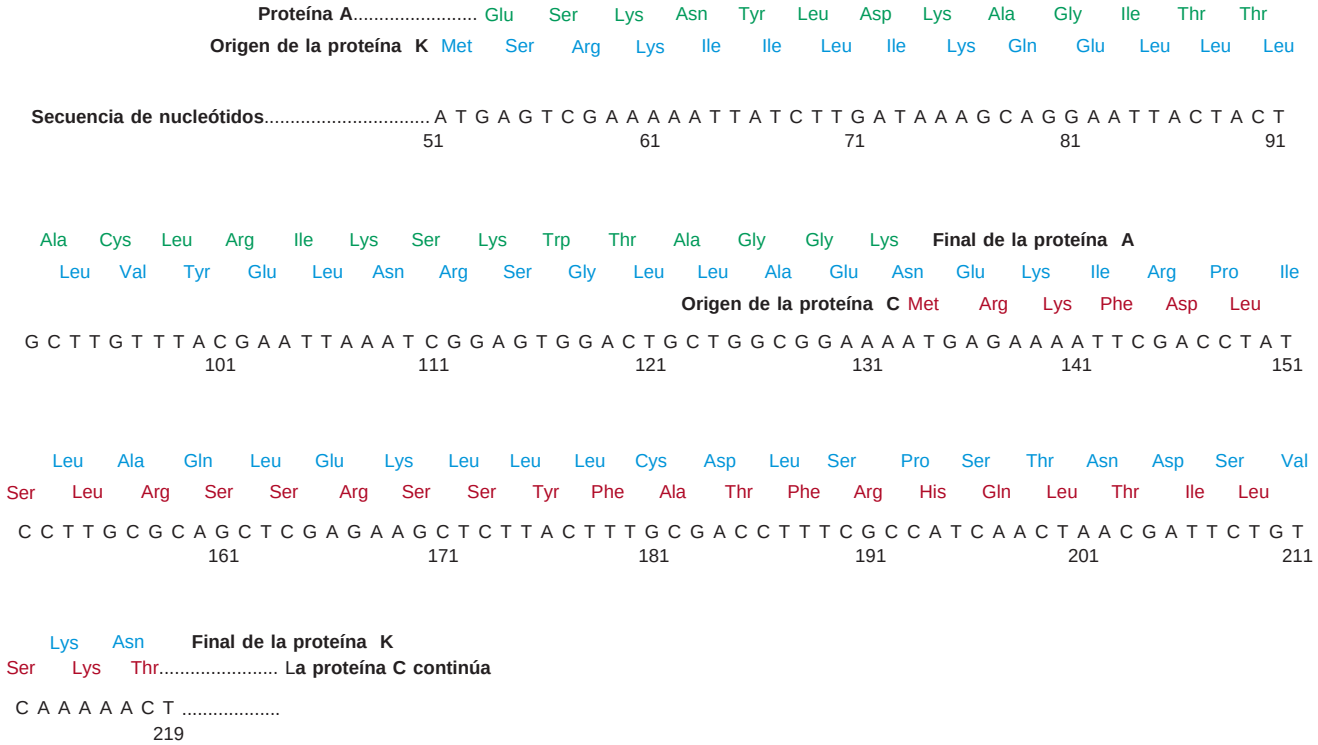


FIGURA 2.53
Secuencias nucleotídicas parciales de genes contiguos y solapados del bacteriófago ϕX174.

Se conoce la secuencia nucleotídica completa de ϕX174. En esta figura se muestra la secuencia desde el nucleotido 51 hasta el 219. Esta secuencia codifica la secuencia de aminoácidos completa de una de las proteínas de ϕX174, la proteína K. Una parte de la misma secuencia, desde el nucleótido 51 al 133, codifica parte de la secuencia de otra proteína, la proteína A. La secuencia que codifica la proteína K, que empieza en el nucleótido 133, también codifica parte de una tercera proteína, la proteína C. Se observan solapamientos similares en otros genes de ϕX174.
Adaptado con permiso de Smith, M. Am. Sci. *67:61, 1979. Journal of Sigma Xi, The Scientific Research Society.*

Los genes funcionales solamente representan una pequeña parte del DNA eucariótico

Los eucariotas tienen genomas mucho más grandes que los procariotas; oscilan entre $1{,}5 \times 10^7$ pb en las levaduras hasta los aproximadamente $1{,}15 \times 10^{11}$ pb del genoma haploide del lirio *Fritillaria assyrinca*. Este último contiene suficiente DNA para codificar cerca de 3 000 000 de genes. Antes de febrero de 2001 se creía que el genoma humano contenía entre 70 000 y 120 000 genes. Sin embargo, los resultados iniciales del Proyecto Genoma Humano sugieren que el genoma humano no contiene más de 30 000 genes. En consecuencia, la información genética no necesita estar tan densamente empaquetada como en las bacterias. Un DNA típico de mamífero, con sólo siete veces más genes que el de *E. coli*, contiene 500 veces más DNA que la bacteria. Así pues, es evidente que los genes que codifican proteínas específicas y las secuencias que controlan la expresión génica no representan la totalidad del DNA en las células eucarióticas. De hecho, sólo el 2-4% del DNA de una célula de mamífero puede ser suficiente para contener todos sus genes. Parte del DNA restante, como el que se encuentra en centrómeros y telómeros, tiene adscritas funciones definidas; pero la mayor parte del DNA no codificador carece de función conocida y se ha calificado como "DNA basura". No obstante, se están acumulando resultados en favor de que este DNA pudiera tener un papel vital en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo.

Las secuencias de nucleótidos indican que los genes eucarióticos no se solapan y que, como promedio, están separados por 40 000 pb. Sin embargo, algunos genes eucarióticos pueden estar más cerca unos de otros en regiones que contienen genes cuya expresión está estrechamente coordinada (familias génicas). La mayoría de los genes eucarióticos están interrumpidos por secuencias nucleotídicas no codificadoras llamadas **intrones** (Figura 2.54). Las secuencias nucleotídicas del gen

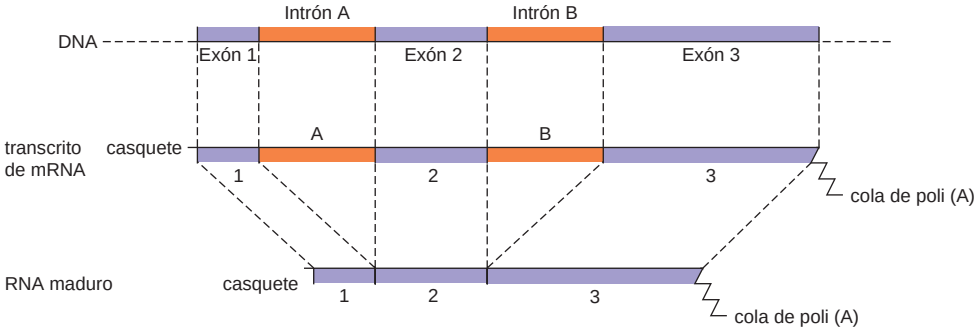


FIGURA 2.54
Representación esquemática de un gen eucariótico.
La línea horizontal superior representa una parte del DNA genómico de un eucariota; la línea inferior representa el mRNA producido a partir del mismo. En este ejemplo, el DNA contiene dos intrones y tres exones. Las secuencias intrónicas son transcritas, pero son eliminadas durante el proceso de corte y empalme, que produce el mRNA maduro.
Adaptado de Crick, F. Science *204:264, 1979. Copyright © 1979 by the American Association for the Advancement of Science.*

que se expresan como RNA (RNA maduro) o como proteína se denominan **exones**. Los intrones son eliminados durante la modificación del transcrito de RNA y los exones restantes son empalmados. Este proceso de elaboración del trascrito original recibe el nombre de **"corte y empalme"** (*splicing*). La secuencia y el tamaño de los intrones varía mucho entre especies, pero generalmente son muy grandes. En conjunto pueden representar entre cinco y diez veces la longitud de los exones. La mayoría de los genes están interrumpidos por intrones al menos una vez, y algunos numerosas veces. No obstante, algunos genes, como el del **α-interferón** humano, no contienen intrones.

Los intrones son frecuentes en genes de vertebrados y plantas fanerógamas, pero infrecuentes en los genes de otras especies. La función biólogica de los intrones no está clara. Su presencia en los eucariotas podría representar una fase de la evolución génica, ya que son escasos en los procariotas y poco frecuentes en los eucariotas inferiores, tales como las levaduras. Los intrones de los genes eucarióticos podrían haber aparecido recientemente en la evolución como resultado de la migración de elementos móviles de DNA (transposones; véase p. 345) desde otras partes del genoma y la inserción en los genes codificadores de proteínas. Posteriormente, estas inserciones podrían haber perdido, por mutación, su movilidad.

Secuencias repetidas

Mientras que en los procariotas la repetición de secuencias particulares de DNA es muy limitada, el DNA de los eucariotas contiene secuencias de nucleótidos repetidas, desde unas pocas veces en ciertos genes codificadores, hasta millones de veces por genoma en ciertas secuencias simples, relativamente cortas. Dependiendo de la especie, el DNA repetitivo puede representar entre el 3% y el 80% del DNA total. En los genomas de mamíferos, incluido el humano, el 25–35% del DNA es repetitivo. Las secuencias se clasifican como de copia única, moderadamente reiteradas y altamente reiteradas. El contenido de DNA de copia única varía en los eucariotas.

Los términos "**reiterado**" y "**repetitivo**" deben distinguirse en la descripción de las secuencias de DNA. El término "reiterado" se utiliza para describir una secuencia única de DNA, normalmente con una longitud de varios centenares de nucleótidos, presente en múltiples copias en el genoma. Se dice que una secuencia individual de DNA es "repetitiva" si cierta secuencia de nucleótidos, normalmente corta, se repite muchas veces a lo largo de la secuencia de DNA.

La mayor parte de las secuencias altamente reiteradas poseen una composición en bases característica y pueden aislarse cortando el DNA en segmentos de unos pocos centenares de nucleótidos y separándolos mediante centrifugación en gradiente de densidad. Estos fragmentos se denominan **DNA satélite,** puesto que aparecen como satélites de la banda de DNA principal después de la centrifugación. Otras secuencias altamente reiteradas que no pueden ser aisladas mediante centrifugación, se pueden identificar en virtud de su rápida reasociación. Algunas secuencias altamente reitera-

das también se pueden aislar mediante digestión del DNA total con endonucleasas de restricción que cortan en puntos específicos de la secuencia reiterada. No es posible definir estrictamente las fronteras entre los diversos tipos de DNA reiterados.

DNA de copia única

Aproximadamente la mitad del genoma humano está constituido por secuencias de nucleótidos únicas, aunque, como se ha indicado anteriormente, sólo una pequeña fracción codifica proteínas específicas. Una parte del DNA contiene **pseudogenes**, secuencias de DNA que presentan una homología de nucleótidos significativa con un gen funcional, pero que contienen mutaciones que evitan su expresión. Estos genes, que pueden estar presentes en una frecuencia tan elevada como un pseudogén por cada cuatro genes funcionales, incrementan significativamente el tamaño de los genomas eucarióticos sin contribuir a su contenido genético expresable. Otras secuencias de DNA de copia única forman intrones y las regiones flanqueantes reguladoras de los genes.

DNA moderadamente reiterado

Esta clase de DNA consiste en copias de secuencias idénticas o estrechamente relacionadas que están reiteradas desde unas pocas veces hasta un millar de veces. Se trata de secuencias relativamente largas, que oscilan entre unos centenares y muchos miles de nucleótidos antes de que se repita la misma secuencia polinucleotídica. Aproximadamente el 20% del DNA de ratón está compuesto por secuencias de unos pocos centenares de bases que están repetidas más de mil veces. Alrededor de un 15% del genoma humano consiste en DNA moderadamente reiterado. Normalmente las secuencias de copia única y las secuencias moderadamente reiteradas están ordenadas en el cromosoma según un patrón denominado **patrón entremezclado**, que consiste en la alternancia de bloques de DNA de copia única y de DNA moderadamente reiterado. Las secuencias moderadamente reiteradas pueden subdividirse en repeticiones entremezcladas cortas y en repeticiones entremezcladas largas, de las cuales se encuentran entre 1000 y 100 000 copias por genoma. Las **repeticiones entremezcladas largas** consisten en secuencias de varios miles de nucleótidos, de las que existen hasta 1000 copias por genoma. Estas repeticiones están flanqueadas por repeticiones directas. Un ejemplo de **repeticiones entremezcladas cortas** es la familia Alu, que constituye una parte sustancial del genoma humano (alrededor del 5%). Las secuencias Alu tienen aproximadamente 300 pb de longitud y están repetidas más de 500 000 de veces. La estructura de las repeticiones entremezcladas cortas, incluida la familia Alu, recuerda a los transposones. Todavía no se ha establecido la función de la familia Alu.

DNA altamente reiterado

En conjunto el DNA de copia única y el DNA moderadamente repetitivo representan normalmente más del 80% de la totalidad del DNA de los genomas eucarióticos. El DNA restante consiste en secuencias, normalmente de menos de 20 nucleótidos, reiteradas millares o millones de veces. Aproximadamente el 10% del DNA de ratón consiste en repeticiones de 10 pb reiteradas millones de veces. Debido a la manera en que están construidos, los **DNA altamente reiterados** también se denominan DNA de secuencia simple. Las secuencias simples se encuentran en el DNA de la mayoría o de la totalidad de los eucariotas. En algunas especies hay un tipo principal de secuencia simple, mientras que en otras varias secuencias simples están repetidas hasta un millón de veces. También se han identificado algunas unidades repetitivas considerablemente más largas en el DNA de secuencia simple. Por ejemplo, en el genoma del mono verde africano se ha encontrado un segmento de 172 pb altamente reiterado que a su vez contiene unas pocas repeticiones. Dado que su composición es característica, el DNA de secuencia simple puede aislarse a menudo como DNA satélite. El DNA satélite que se encuentra en los centrómeros de los eucariotas superiores consiste en miles de copias en tándem de una o de unas pocas secuencias cortas. Las secuencias satélite tienen tan solo 5–10 pb de largo. El DNA de secuencia simple (satélite) es uno de los constituyentes de los telómeros, donde tienen un papel bien definido en la replicación del DNA.

DNA de repetición invertida

Las repeticiones invertidas son un motivo estructural del DNA. Las repeticiones invertidas cortas de hasta seis nucleótidos, como la secuencia palindrómica GAATTC,

por ejemplo, se encuentran distribuidas al azar aproximadamente una vez cada 3000 nucleótidos. Estas repeticiones cortas no pueden formar una estructura estable "en horquilla", como lo hacen las secuencias palindrómicas más largas. No es probable que las repeticiones invertidas suficientemente largas para formar "horquillas" sean fruto del azar, y deben clasificarse como una clase separada de secuencias eucarióticas. En el DNA humano hay aproximadamente dos millones de repeticiones invertidas con una longitud media de 200 pb, aunque se han detectado secuencias invertidas de longitud superior a los 1000 pb. La mayoría de las repeticiones invertidas se repiten 1000 o más veces por célula.

2.6 VISIÓN GENERAL DEL RNA

Las moléculas de RNA juegan diferentes papeles en la transferencia de información en la célula (Tabla 2.5). La mayor parte del RNA celular es RNA ribosómico (rRNA). Los ribosomas son grandes complejos de proteínas y RNA que llevan a cabo la traducción. Los RNA mensajeros (mRNA) sirven de molde para la síntesis de proteínas; transportan la información desde el DNA a la maquinaria celular de síntesis proteica. Los RNA de transferencia (tRNA) transfieren aminoácidos específicos desde las reservas de aminoácidos solubles hasta los ribosomas y aseguran su correcto alineamiento antes de la formación del enlace peptídico. Otros RNA celulares son importantes en la elaboración del RNA y en la exportación de proteínas fuera de la célula.

TABLA 2.5 Características de los RNA celulares.

Tipo de RNA	*Abreviatura*	*Función*	*Tamaño y coeficiente de sedimentación*	*Sitio de síntesis*	*Rasgos estructurales*
RNA mensajero					
Citosóico	mRNA	Transferencia de información genética desde el núcleo al citoplasma o desde el gen al ribosoma	Depende del tamaño de la proteína; 1000 a 10 000 nucleótidos	Nucleoplasma	Extremo 5′-bloqueado; cola de poli(A) en el extremo 3′; secuencias no traducidas antes y después de las regiones codificadoras; pocos apareamientos de bases y metilaciones
Mitocondrial	mt mRNA		9S–40S	Mitocondria	
RNA de transferencia					
Citosólico	tRNA	Transferencia de aminoácidos al complejo mRNA-ribosoma y corrección de la inserción en la secuencia	65–110 nucleótidos 4S	Nucleoplasma	Muchas bases apareadas; muchos nucleótidos modificados; estructura específica común
Mitocondrial	mt tRNA		3,2S–4S	Mitocondria	
RNA ribosómico					
Citosólico	rRNA	Armazón estructural de los ribosomas	28S, 5400 nucleótidos 18S, 2100 nucleótidos 5,8S, 158 nucleótidos 5S, 120 nucleótidos	Nucleolo Nucleolo Nucleolo Nucleoplasma	El 5,8S y el 5S tienen muchas bases apareadas; el 28S y el 18S tienen algunas regiones con bases apareadas y algunos nucleótidos metilados
Mitocondrial	mt rRNA		16S, 1650 nucleótidos 12S, 1100 nucleótidos	Mitocondria	
RNA nuclear heterogéneo	hnRNA	Algunos son precursores de mRNA y otros RNA	Muy variable de 30S a 100S	Nucleoplasma	Los precursores de mRNA pueden tener bloqueados los extremos 5′ y poseer colas poli(A) en 3′; muchos contienen bucles con bases apareadas
RNA nuclear pequeño	snRNA	RNA estructurales y reguladores en la cromatina	100–300 nucleótidos	Nucleoplasma	
RNA citosólico pequeño [7S(L) RNA]	scRNA	Selección de proteínas para la exportación	129 nucleótidos	Citosol y retículo endoplasmático rugoso	Se asocia con proteínas para formar parte de la partícula de reconocimiento de la señal

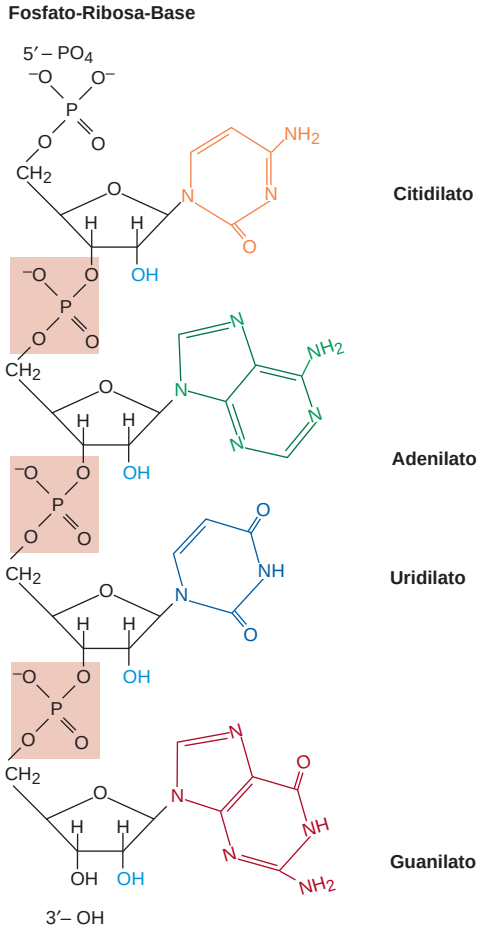


FIGURA 2.55
Estructura de los enlaces fosfodiéster 3′,5′ entre ribonucleótidos que forman una hebra sencilla de RNA.
El fosfato une el grupo 3′-OH de una ribosa con el 5′-OH de la siguiente ribosa. Este enlace produce un polirribonucleótido con un "armazón" azúcar–fosfato. Las bases púricas y pirimidínicas se extienden hacia fuera del eje del armazón y pueden aparearse con bases complementarias para formar regiones de doble hélice con las bases apareadas.

2.7 ESTRUCTURA DEL RNA

El RNA es un polímero de ribonucleósidos 5′-monofosfato

El **RNA** es un polímero lineal no ramificado de ribonucleósidos monofosfato. Las purinas del RNA son adenina y guanina; las pirimidinas son citosina y uracilo. A excepción del uracilo, que reemplaza a la timina, éstas son las mismas bases que se encuentran en el DNA. Los nucleótidos de A, G, C y U se incorporan al RNA durante la transcripción. Muchos RNA también contienen **nucleótidos modificados**, que se producen por transformación. Estos nucleótidos son especialmente característicos de especies de RNA estables (tRNA y rRNA); sin embargo, también se encuentran algunos nucleótidos metilados en el mRNA eucariótico. En su mayor parte, los nucleótidos modificados están implicados en la "regulación fina", más que en funciones indispensables para la célula.

Los enlaces fosfodiéster 3′,5′ del RNA forman una cadena o esqueleto a partir del cual se extienden las bases (Figura 2.55). La longitud de los RNA eucarióticos varía desde aproximadamente 65 nucleótidos hasta más de 200 000. Las secuencias de RNA son complementarias de las secuencias de bases de porciones específicas de una sola hebra del DNA. Por lo tanto, a diferencia de la composición de bases del DNA, las relaciones molares de (A + U) y (G + C) del RNA no son iguales. El RNA celular es lineal y de hebra sencilla, pero en el genoma de algunos virus se encuentra RNA de doble hebra.

La composición química del RNA es similar a la del DNA. Ambos contienen enlaces fosfodiéster cargados negativamente, y las bases son químicamente muy similares. Las diferencias químicas entre el DNA y el RNA se deben principalmente a dos factores. Primero, el RNA contiene ribosa en lugar de 2′-desoxirribosa como componente glucídico del nucleótido y, segundo, los RNA son generalmente de cadena sencilla en lugar de cadena doble.

El grupo 2′-hidroxilo hace que los enlaces fosfodiéster de una molécula de RNA sean más susceptibles a la hidrólisis química que los del DNA. Los enlaces fosfodiéster del RNA se hidrolizan rápidamente en disolución alcalina, mientras que los enlaces del DNA son estables. La inestabilidad química del RNA se manifiesta en su inestabilidad metabólica. Algunos RNA, como los mRNA bacterianos, son sintetizados, utilizados y degradados en pocos minutos. Otros, como el rRNA humano, son más estables metabólicamente, con una vida media de días. Sin embargo, incluso los RNA más estables son mucho menos estables que el DNA.

La estructura secundaria del RNA incorpora apareamiento de bases intramolecular

Las moléculas de RNA son de cadena sencilla y no suelen formar doble hélices extensas. La estructura secundaria del RNA es el resultado de la presencia de regiones relativamente cortas con **apareamiento de bases intramolecular**, es decir, pares de bases formados por secuencias complementarias dentro de la misma molécula. Incluso las secuencias no apareadas de los RNA de cadena sencilla contienen una

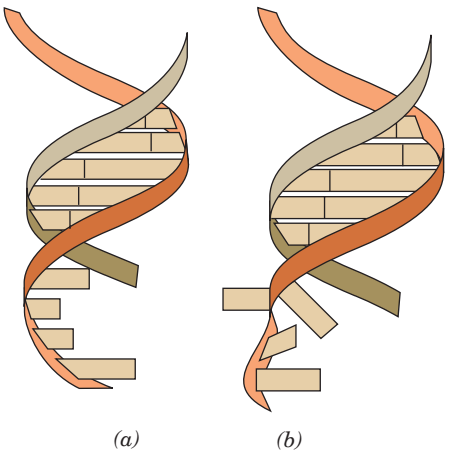


FIGURA 2.56
Estructura helicoidal del RNA.
Modelos que representan una estructura helicoidal debida al apilamiento de bases en el extremo CCA del tRNA (*a*) y una que carece de una hélice ordenada cuando no hay apilamiento en una región de bases no apareadas (*b*).
Adaptado de Sprinzl, M. y Cramer, F. Prog. Nucl. Res. Mol. Biol. *22:9, 1979.*

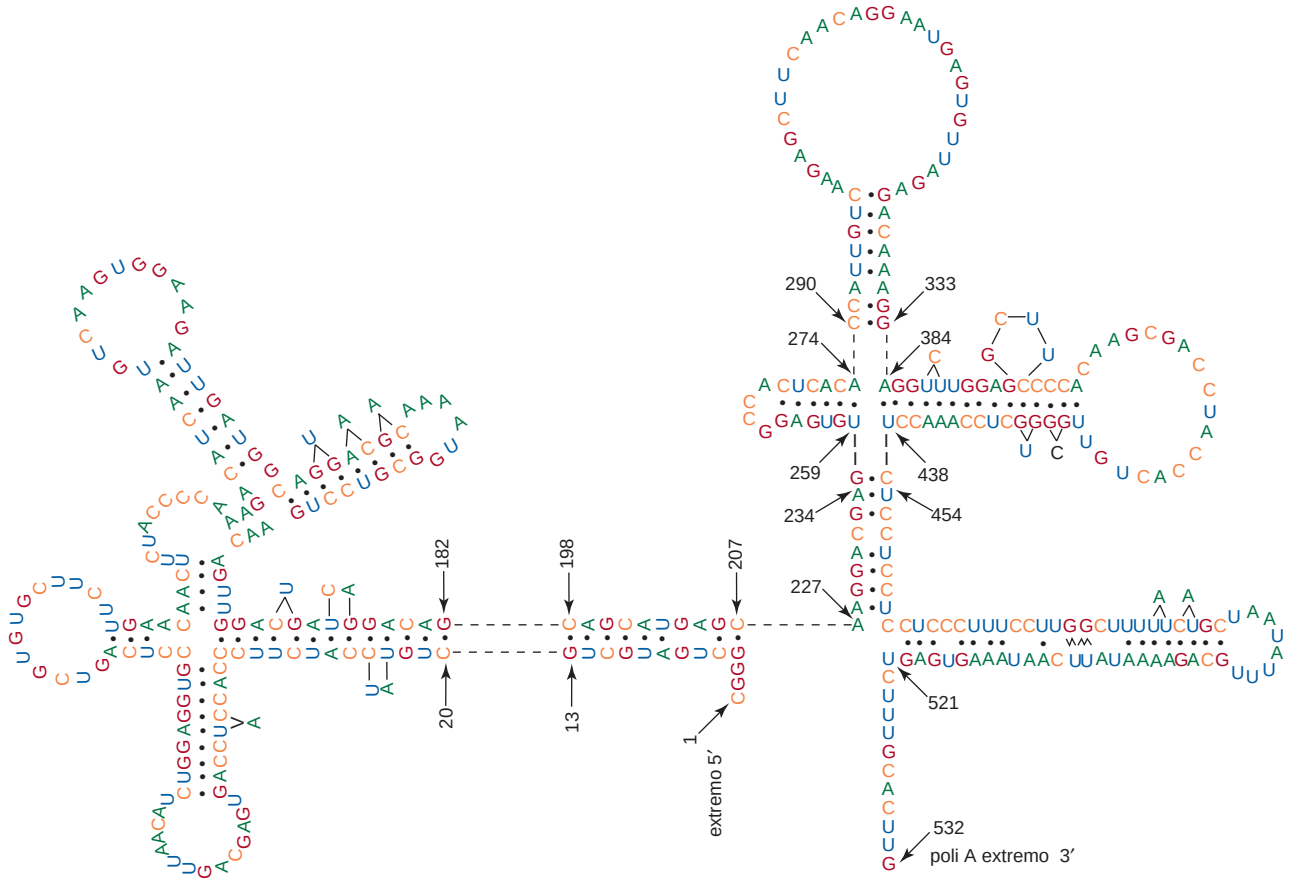


FIGURA 2.57
Regiones de apareamiento de bases propuestas para el mRNA de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón.
Las estructuras con apareamientos de bases que se muestran tienen energías libres de al menos −5 kcal. Obsérvese la variación en el tamaño de los bucles y en la longitud de las regiones apareadas.
Adaptado de Hamlyn, P. H., Browniee, G. G., Cheng, C. C., Gait, M. J. y Milstein, C. Cell *15:1067, 1978.*

cantidad considerable de estructura helicoidal (Figura 2.56). Esta estructura helicoidal se debe a las intensas fuerzas de apilamiento entre A, G y C. El RNA de doble hélice es generalmente de "tipo A", con aproximadamente 11 nucleótidos por vuelta de doble hélice.

Frecuentemente, a las regiones de doble hélice del RNA se les llama "**horquillas**". Existen variaciones considerables en los detalles estructurales de las "horquillas", entre las que se encuentran la longitud de las regiones apareadas y el tamaño y número de los bucles no apareados (Figura 2.57). Los RNA de transferencia constituyen ejemplos excelentes de apilamiento de bases y formación de puentes de hidrógeno en una molécula de RNA de cadena única (Figura 2.58). Aproximadamente el 60% de las bases están apareadas en cuatro brazos de doble hélice. Además, las regiones "no apareadas" pueden formar pares de bases con bases libres del mismo o de otro bucle, contribuyendo así a la estructura terciaria de la molécula. La región del anticodón en el tRNA es un bucle de siete nucleótidos de bases apiladas sin aparear. La hélice parcial producida por el apilamiento de bases en este bucle se une, por apareamiento de bases, a un codón complementario del mRNA, de manera que pueda tener lugar la traducción.

Las moléculas de RNA tienen estructura terciaria

Las estructuras de los RNA funcionales son más complejas que las hélices formadas por apilamiento de bases y puentes de hidrógeno mencionadas anteriormente. *In vivo*, los RNA son moléculas dinámicas que experimentan cambios conforma-

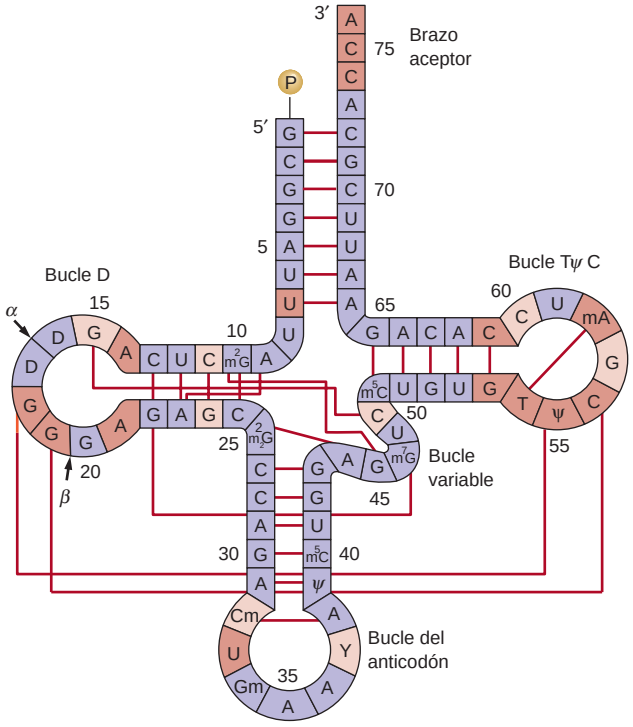


FIGURA 2.58
Estructura en hoja de trébol del tRNA.
Diagrama en hoja de trébol de la estructura bidimensional y secuencia de nucleótidos del $tRNA^{Phe}$ de levadura. Las líneas rojas que conectan nucleótidos indican bases unidas por puentes de hidrógeno. Los cuadrados de color rosa representan los nucleótidos constantes. Los cuadrados marrones representan purinas o pirimidinas constantes. La inserción de nucleótidos en el bucle D se produce en las posiciones α o β en diferentes tRNA.
Tomado de Quigley, G. J. y Rich, A. Science 194:797, 1976. Copyright © 1976 by the American Association for the Advancement of Science.

cionales durante su síntesis, modificación y funcionamiento. Las proteínas asociadas a las moléculas de RNA a menudo aumentan su estabilidad. De hecho, el RNA celular realiza sus funciones asociado a proteínas y no como RNA libre. La **estructura terciaria** de las moléculas de RNA resulta del apilamiento de bases y de los enlaces de hidrógeno entre diferentes partes de la molécula. El tRNA suministra numerosos ejemplos. El tRNA en disolución está plegado en "forma de L" compacta (Figura 2.59), estabilizada por apareamientos de Watson y Crick e interacciones de

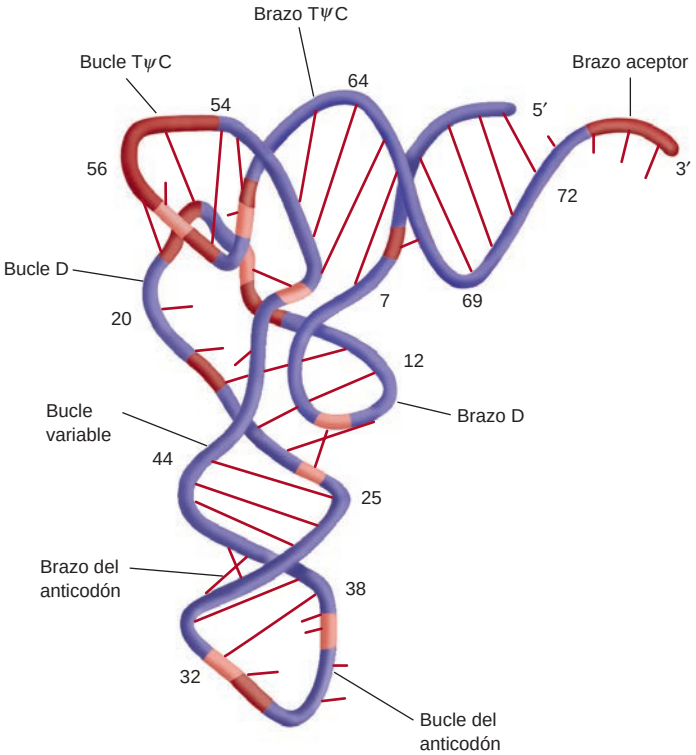


FIGURA 2.59
Estructura terciaria del tRNA.
Plegamiento terciario de la estructura en hoja de trebol del $tRNA^{Phe}$. Los puentes de hidrógeno están representados por barras cruzadas. Compárese esta representación con la Figura 2.58.
Tomado de Quigley, G. J. y Rich, A. Science 194:797, 1976. Copyright © 1976 by the American Association for the Advancement of Science.

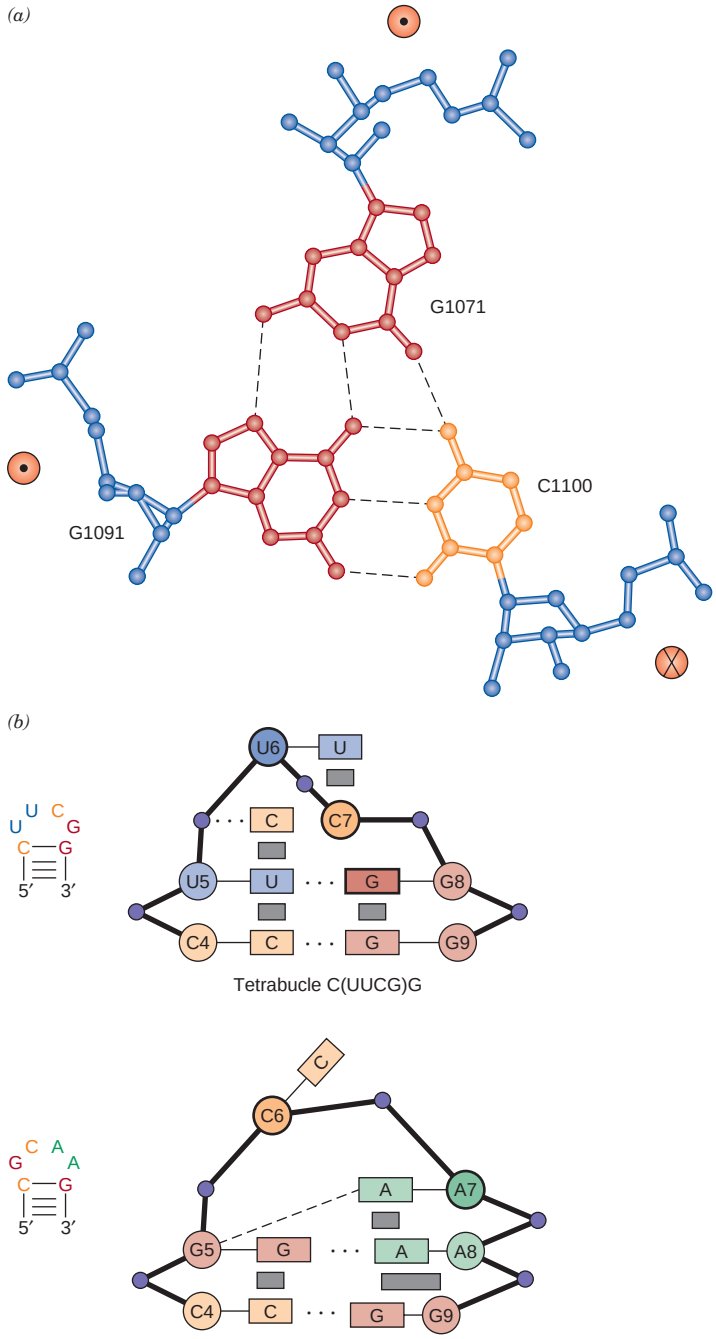


FIGURA 2.60
Puentes de hidrógeno en el tRNA.
(*a*) Un triplete de bases del RNA ribosómico 23S. En este caso, la tercera base (G1071) forma puentes de hidrógeno con la cara "superior" o de "Hoogsteen" de G1091 y C1100. (*b*) Diagrama esquemático de dos bucles de cuatro nucleótidos con estructuras similares. Ambas estructuras están estabilizadas por apilamiento de las bases del bucle, por puentes de hidrógeno no de Watson y Crick entre las bases y por puentes de hidrógeno entre los residuos de azúcar, fosfato y ribosa.
La parte (a) está adaptada de Westhof, E. y Fritsch, V. Structure *8:R55, 2000; la parte (b) está adaptada de Wyatt, J. y Tinoco, I. Jr. En: R. F. Gesteland y J. F. Atkins, (Eds.),* The RNA World. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1993, p. 471.*

bases entre más de dos nucleótidos. Estas interacciones también se encuentran en otros RNA. La Figura 2.60 muestra un triplete de bases bien definido del RNA ribosómico bacteriano. Las bases pueden donar átomos de hidrógeno para unirse al esqueleto fosfodiéster. El 2′-OH de la ribosa también es un importante dador y aceptor de hidrógenos. Todas estas interacciones contribuyen a la forma plegada de las moléculas de RNA.

Otras características terciarias se dedujeron de la estructura tridimensional de RNA en disolución o en forma cristalina. El término **"tetrabucle"** se refiere a secuencias específicas (p. ej., UUCG o GAGA) que se encuentran a menudo en el extremo cerrado de las horquillas de RNA (Figura 2.60). Los tetrabucles confieren estabilidad adicional a las horquillas mediante puentes de hidrógeno internos entre bases y azúcares. Los tetrabucles pueden formar puentes de hidrógeno con regio-

nes de la doble hélice o con bucles internos en otras regiones del RNA, con la consiguiente estabilización de la estructura terciaria.

2.8 TIPOS DE RNA

Tradicionalmente, las especies de RNA se han clasificado en RNA de transferencia, ribosómico y mensajero, según su función habitual; sin embargo, las moléculas de RNA también realizan otras funciones en la célula.

El RNA de transferencia tiene dos funciones: la activación de los aminoácidos y el reconocimiento de los codones del mRNA

Los **tRNA** constituyen aproximadamente el 15% del RNA celular total. El **RNA de transferencia** es un intermediario esencial entre el DNA y las proteínas en el dogma central de la biología molecular. La unión a las moléculas de tRNA **activa los aminoácidos** para la síntesis de proteínas, de manera que la formación del enlace peptídico sea energéticamente favorable. Los aminoácidos activados son transportados hasta los ribosomas, donde son transferidos a la cadena polipeptídica naciente (de ahí el nombre de tRNA). El tRNA también reconoce la secuencia de nucleótidos del mRNA para asegurar la incorporación del aminoácido correcto en la cadena polipeptídica que se está sintetizando. Estas dos funciones se corresponden con dos regiones esenciales del tRNA: la secuencia CCA del extremo 3′-OH, al cual se unen enzimáticamente aminoácidos específicos, y el **triplete anticodón**, que reconoce la secuencia del mRNA. Los codones del mRNA están formados por tres nucleótidos. Los tripletes del codón y del anticodón se aparean durante la formación del enlace peptídico.

Cada tRNA sólo puede transferir un único aminoácido. Aunque en la síntesis de proteínas sólo se utilizan 20 aminoácidos, los seres vivos sintetizan un conjunto más numeroso de tRNA. Ello se debe a la redundancia del código genético, que posee más de un codón por aminoácido. Por ejemplo, la secuencia genómica de la bacteria *Haemophilus influenzae* contiene genes para 54 especies de tRNA. Las mitocondrias sintetizan un número mucho menor de tRNA. Los tRNA que aceptan el mismo aminoácido se denominan **isoaceptores**. Un tRNA que acepta fenilalanina se escribe $tRNA^{Phe}$, mientras que uno que acepta tirosina sería $tRNA^{Tyr}$.

Los tRNA tienen una longitud de entre 65 y 110 nucleótidos, lo que corresponde a un intervalo de masas moleculares de 22 000 a 37 000. Las secuencias de todas las moléculas de tRNA (se conocen varios millares) adoptan una estructura secundaria común en **hoja de trébol**, por apareamiento de bases de Watson y Crick que forma tres estructuras en brazo y bucle. El triplete del anticodón se encuentra en una de la "hojas" del trébol, mientras que el aceptor CCA se encuentra en el "brazo". Esta disposición, en la cual el anticodón y el brazo aceptor se encuentran en los extremos de la molécula en forma de L, está preservada en la estructura terciaria del $tRNA^{Phe}$ (Figura 2.59). Puentes de hidrógeno adicionales, no pertenecientes al tipo de Watson y Crick, forman la estructura terciaria de la molécula en forma de L. Los tRNA contienen **nucleótidos modificados**, por ejemplo, 7-metilguanina en la posición 46 de la Figura 2.58. Los nucleótidos modificados afectan a la estructura y a la estabilidad del tRNA, pero no son esenciales para su funcionamiento. Por ejemplo, una base modificada junto al anticodón hace más eficiente el reconocimiento del codón, pero un tRNA sin esta modificación puede ser leído correctamente por el ribosoma.

Muchos rasgos estructurales son comunes a todas las moléculas de tRNA. El brazo aceptor de aminoácidos está formado por siete pares de bases que terminan con el triplete de nucleótidos CCA. Este triplete CCA no está apareado. El brazo de dihidrouracilo, o brazo D, tiene tres o cuatro pares de bases, mientras que los brazos T y del anticodón tienen cada uno cinco pares de bases. Tanto el bucle del anticodón como el bucle T tienen siete nucleótidos. Las diferencias en el número de nucleótidos entre tRNA diferentes corresponden al bucle variable. La mayor parte de los tRNA tienen bucles variables pequeños de 4–5 nucleótidos, mientras que otros tienen bucles mayores, de 13–21 nucleótidos. Algunos nucleótidos ocupan posiciones constantes en todos los tRNA (véanse las cajas de color naranja oscuro de la Figura 2.58).

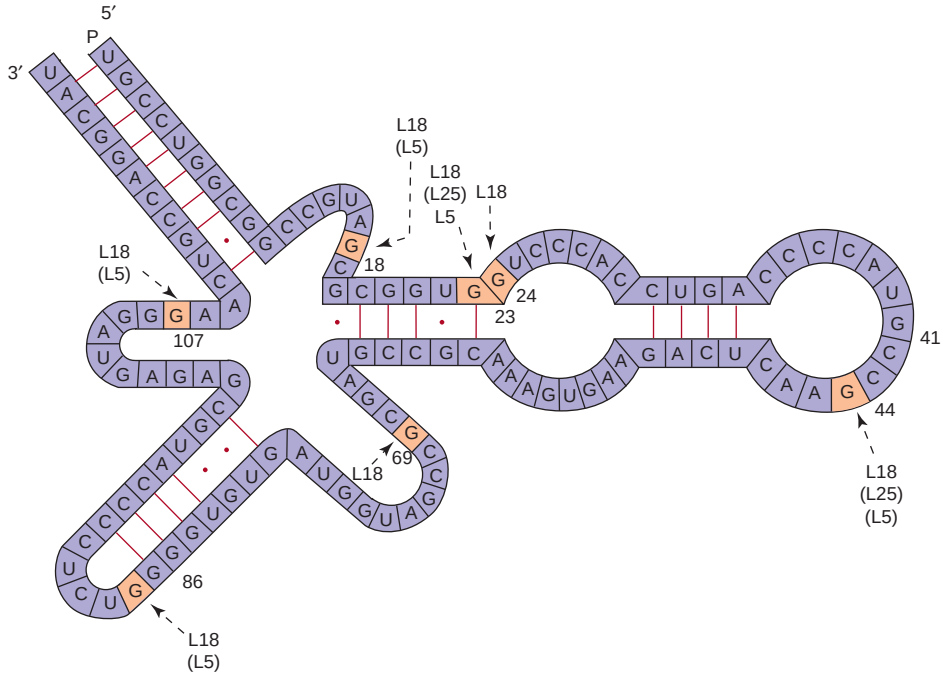


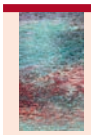
FIGURA 2.61
Estructura secundaria por apareamiento de bases propuesta para el rRNA 5S.
Las flechas indican las regiones protegidas por proteínas en la subunidad ribosómica grande.
Información combinada de Fox, G. E. y Woese, C. R. Nature *256:505, 1975; y R. A. Garrett y P. N. Gray.*

El RNA ribosómico forma parte del aparato de la síntesis proteica

La síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas. En los eucariotas estos complejos están formados por cuatro moléculas de RNA, que representan aproximadamente dos terceras partes de la masa de la partícula, y 82 proteínas. La subunidad pequeña, la **partícula 40S**, contiene un **rRNA 18S** y 33 proteínas. La subunidad grande, la **partícula 60S**, contiene los rRNA **28S**, **5,8S** y **5S** y 49 proteínas. El complejo total se denomina **ribosoma 80S**. Los ribosomas procarióticos son más pequeños; la subunidad **30S** contiene un solo **rRNA 16S** y 21 proteínas, mientras que la subunidad mayor 50S contiene los **rRNA 5S** y **23S** y 34 proteínas (en la p. 242 se trata la estructura de los ribosomas).

El rRNA representa el 80% del RNA celular y es metabólicamente estable. La estabilidad es necesaria para el funcionamiento repetido del ribosoma y se ve aumentada por la asociación con las proteínas ribosómicas. En los eucariotas, los rRNA 28S (4718 nucleótidos), 18S (1874 nucleótidos) y 5,8S (160 nucleótidos) se sintetizan en la región nucleolar del núcleo. El rRNA 5S (120 nucleótidos) no se transcribe en el nucleolo, sino a partir de genes separados dentro del nucleoplasma (Figura 2.61). Los tres rRNA mayores se sintetizan como una sola cadena polinucleotídica, que es transformada para producir las moléculas individuales. Las modificaciones de los nucleótidos del rRNA consisten principalmente en **metilaciones** en la posición 2′ de la ribosa, que producen 2′-*O*-metilrribosa. La metilación del rRNA se ha relacionado directamente con la resistencia bacteriana a los antibióticos de las especies patógenas (véase la Apli. Clín. 2.8). En el rRNA 18S se encuentra una pequeña cantidad de N^6-dimetiladenina. El rRNA 28S tiene unos 45 grupos metilo y el rRNA 18S tiene 30.

El RNA ribosómico es el componente catalítico del ribosoma. La estructura cristalina por difracción de rayos X de la subunidad mayor del ribosoma bacteriano muestra que el sitio activo para la formación del enlace peptídico está formado solamente por el RNA 23S, las cadenas laterales de cualquier aminoácido potencialmente catalítico se encuentran demasiado lejos para participar directamente en la reacción.



APLICACIÓN CLÍNICA 2.8
Resistencia de los estafilococos a la eritromicina

Las bacterias expuestas a los antibióticos en la práctica clínica o agrícola a menudo desarrollan resistencia a los mismos. Esta resistencia puede ser el resultado de mutaciones en el DNA de las células diana que dan lugar a descendencia resistente. Una forma de resistencia distinta, y mucho más peligrosa clínicamente, surge como consecuencia de la propagación en la población bacteriana de plásmidos portadores de resistencia a los antibióticos. Estos plásmidos pueden contener determinantes de resistencia múltiples que hacen ineficaces a varios antibióticos a la vez.

La eritromicina inhibe la síntesis proteica uniéndose a la subunidad mayor del ribosoma. *Staphylococcus aureus* puede adquirir resistencia a la eritromicina y a antibióticos similares como consecuencia de una RNA metilasa codificada en un plásmido que convierte una única adenosina del rRNA 23S en N^6-dimetiladenosina. Puesto que la lincomicina y la clindamicina se unen al mismo sitio del ribosoma, el plásmido también causa resistencia cruzada frente a estos antibióticos. La síntesis de la metilasa es inducida por la eritromicina.

Un microorganismo que produzca un antibiótico debe ser inmune a éste; de lo contrario morirá a causa de su propio producto tóxico. El organismo productor de la eritromicina, *Streptomyces erythreus* posee una rRNA metilasa que actúa en el mismo sitio del ribosoma que la de *S. aureus*. ¿Cuál apareció primero? Es probable que muchos de los genes de resistencia evolucionaran a partir de los genes de los organismos productores. En varios casos, las secuencias de DNA de los genes de resistencia con una misma especificidad están conservados en los organismos productores y en los organismos diana. Podemos, pues, considerar la resistencia a los antibióticos transportada por plásmidos como un caso de "ingeniería genética natural", en el cual el DNA de un organismo productor (p. ej., *Streptomyces*) es apropiado y expresado por otro (p. ej., *Staphylococcus*)

Cundliffe, E. How antibiotic-producing microorganisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:207, 1989.

Los RNA mensajeros llevan la información de la estructura primaria de las proteínas

Los mRNA son los portadores directos de la información genética desde el genoma a los ribosomas. Todos los mRNA eucarióticos son **monocistrónicos**, es decir, contienen información de una sola cadena polipeptídica. En los procariotas, las especies de mRNA son a menudo **policistrónicas** y codifican más de una proteína. El fenotipo y el estado funcional de una célula están relacionados directamente con su contenido en mRNA. En el citoplasma, los mRNA tienen una duración relativamente corta. Algunos son sintetizados y almacenados en un estado inactivo o latente en el citoplasma, listos para una rápida respuesta cuando se requiera la síntesis de proteínas. En diversos animales, inmediatamente después de la fertilización, en el huevo tiene lugar una rápida síntesis proteica en ausencia de transcripción, lo que indica la presencia de mRNA y ribosomas preformados en el citoplasma del huevo.

Los mRNA eucarióticos tienen rasgos estructurales únicos que no se encuentran ni en el rRNA ni en el tRNA (Figura 2.62). Dado que la información contenida

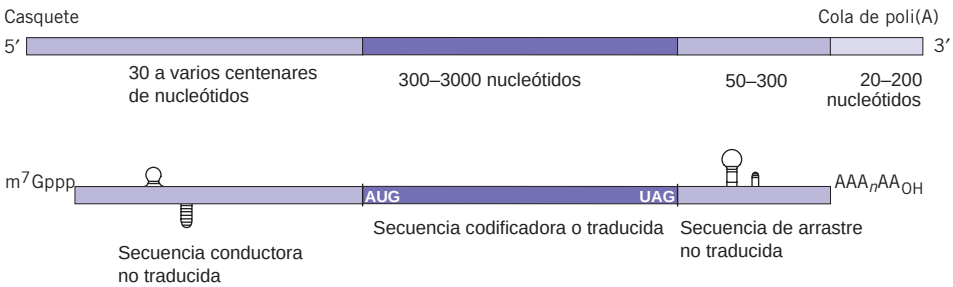


FIGURA 2.62
Estructura general de un mRNA eucariótico.
Hay un extremo 5′ "bloqueado" (casquete), seguido por una región no traducida que contiene una secuencia promotora. La región codificadora empieza con el codón de iniciación AUG y continúa hasta la secuencia de terminación de la traducción UAG, UAA o UGA. A continuación se encuentra la región de arrastre no traducida y la cola de poli(A) en el extremo 3′.

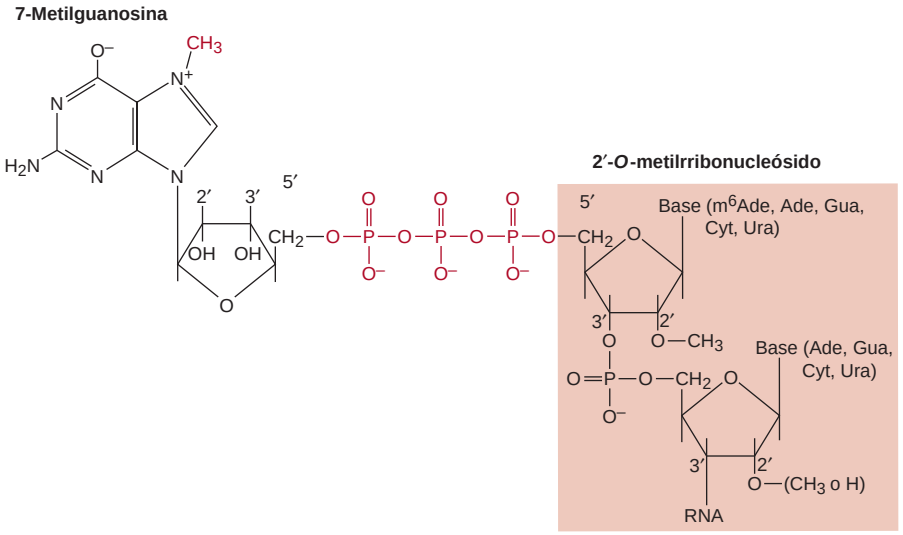


FIGURA 2.63
Diagrama de la estructura del "casquete" o extremo 5′ bloqueado del mRNA.
La 7-metilguanosina se invierte para formar un enlace entre su 5′-fosfato con el 5′-fosfato del primer nucleótido del mRNA. Este nucleótido es, frecuentemente, una purina metilada.

en el mRNA se encuentra en la secuencia lineal de nucleótidos, la integridad de esta secuencia es sumamente importante. Cualquier pérdida o cambio de nucleótidos podría alterar la estructura de la proteína que se está traduciendo. La traducción del mRNA en los ribosomas también debe comenzar y finalizar en secuencias específicas. En los eucariotas, un "**casquete**" en el extremo 5′ del mRNA especifica dónde debe empezar la traducción. Los casquetes de los mRNA eucarióticos contienen un enlace fosfodiéster invertido, una base metilada unida mediante un enlace **5′-fosfato–5′-fosfato,** en lugar del habitual enlace 3′,5′-fosfodiéster. El casquete está unido al primer nucleótido transcrito, habitualmente una purina, y metilado en el 2′-OH de la ribosa (Figura 2.63). El casquete tiene a continuación una secuencia que no se traduce, llamada **secuencia "conductora"**, en el lado 5′ de la región codificadora. A continuación de la secuencia conductora, se encuentra el **codón de inicio**, casi siempre AUG, y la región codificadora de la molécula. Al final de la secuencia codificadora se encuentra una **secuencia de terminación**, que señala el final del polipéptido y la liberación del ribosoma. Sigue una segunda secuencia no traducida o "secuencia de arrastre" que acaba en una serie de 20-200 nucleótidos de adenina, denominada **cola de poli(A)**, que constituye el extremo 3′ del mRNA.

El casquete en 5′ tiene un efecto positivo sobre el inicio de la traducción del mensaje. En el inicio de la traducción de un mRNA, la estructura en casquete es reconocida por una única proteína ribosómica, que actúa de factor de inicio (véase p. 245). La secuencia de poli(A) afecta a la estabilidad del mRNA; la degradación de un mRNA a menudo empieza con el acortamiento de la cola de poli(A).

Las mitocondrias contienen especies de RNA únicas

Las mitocondrias (mt) tienen su propio aparato de síntesis proteica, que incluye ribosomas, tRNA y mRNA. Los rRNA mitocondriales 12S y 16S se trascriben a partir del DNA mitocondrial (**mtDNA**), de igual modo que 22 tRNA específicos y 13 mRNA, la mayoría de los cuales codifican proteínas de la cadena de transporte electrónico y la ATP sintasa. Obsérvese que el número de tRNA mitocondriales es menor que el de especies de tRNA citosólicos o de procariotas; generalmente hay solamente una especie de tRNA mitocondrial por aminoácido. Los mtRNA representan el 4% del RNA celular total. Son transcritos por una RNA polimerasa mitocondrial específica y se elaboran a partir de un par de RNA precursores que contienen secuencias de tRNA y mRNA. La expresión de los genomas nuclear y mitocondrial está estrechamente coordinada. La mayor parte de los enzimas aminoacilantes de los tRNA mitocondriales así como todas las proteínas ribosómicas mitocondriales están codificados por genes nucleares, traducidos en el citosol y transportados hasta las mitocondrias. Las bases modificadas de las especies de tRNA mitocondrial son sintetizadas por enzimas codificados en el DNA nuclear.

RNA en partículas de ribonucleoproteína

En el núcleo, el citosol y las mitocondrias pueden encontrarse otras especies pequeñas y estables de RNA. Estos pequeños RNA funcionan como partículas de ribonucleoproteína (RNP), con una o más subunidades de proteína unidas. Diferentes especies de RNP se han relacionado con la maduración del RNA, el transporte y el control de la traducción, así como con el reconocimiento de las proteínas destinadas a la exportación. Las funciones de estas especies, cuando se conocen, se describen con mayor profundidad en la exposición de los procesos metabólicos específicos.

RNA catalítico: Ribozimas

El RNA puede actuar de catalizador. Se ha observado en varios casos que el RNA presente en una partícula de ribonucleoproteína es la subunidad catalíticamente activa del enzima. En otros casos, las reacciones catalíticas pueden realizarse *in vitro* por el RNA en ausencia de proteína. Los enzimas cuyas subunidades de RNA llevan a cabo reacciones catalíticas se denominan **ribozimas**. Existen cinco tipos de ribozimas. En tres de ellos, los RNA llevan a cabo reacciones de automodificación, mientras que los otros, la **ribonucleasa P (RNasa P)** y el rRNA, son auténticos catalizadores que actúan sobre sustratos distintos.

En el protozoo ciliado *Tetrahymena thermofila* se elimina un intrón en el precursor del rRNA mediante una reacción con múltiples pasos (Figura 2.64). Un nucleósido o un nucleótido de guanosina reaccionan con el enlace fosfodiéster intrón–exón para escindir el exón dador del intrón. Esta reacción de transesterificación la realiza el propio intrón plegado. Seguidamente el exón dador libre ataca de manera similar el enlace fosfodiéster exón-intrón del extremo aceptor del intrón. Se han encontrado intrones de este tipo (**intrones del grupo I**) en varios genes de mitocondrias de hongos, de bacterias y del bacteriófago T4. Aunque estos intrones no son auténticos enzimas *in vivo*, debido a que solamente realizan un ciclo de reacción, pueden llevar a cabo reacciones catalíticas en determinadas condiciones.

Los **intrones de autoempalme del grupo II** se encuentran en los precursores del RNA mitocondrial de levaduras y otros hongos. Aunque estos RNA son capaces de autoempalmarse, hay un gran paralelismo entre esta reacción y la eliminación de los intrones de los precursores del mRNA durante su maduración (véase el Capítulo 5).

El grupo III de **RNA autocortable** se encuentra en el RNA genómico de varios virus de plantas. Estos RNA se cortan a sí mismo durante la maduración de moléculas de RNA genómico individuales, a partir de grandes precursores multiméricos. Se ha determinado la estructura tridimensional del **ribozima en cabeza de martillo,** miembro de esta tercera clase de ribozimas (Figura 2.65). El ciclo catalítico no se conoce en su totalidad, pero el grupo amino de una citosina juega un papel esencial en la reacción de corte. El fosfato del enlace cortado queda en la posición 3′ hidroxilo del RNA producto de la reacción. También se encuentra un RNA autocortable en un pequeño virus satélite, el virus delta de la hepatitis, que está asociado a casos graves de hepatitis infecciosa humana. Todos los RNA autoprocesables anteriores pueden actuar como verdaderos catalizadores (es decir, con recambio múltiple) tanto *in vivo* como *in vitro*.

El cuarto tipo de ribozima, la **ribonucleasa P,** contiene proteína y RNA. En la célula actúa como un verdadero enzima, cortando precursores de tRNA para generar el extremo 5′ maduro de las moléculas. La RNasa P reconoce motivos estructurales conservados de los precursores del tRNA (p. ej., el brazo aceptor y la secuencia CCA), y no hace un uso extensivo del apareamiento de bases para unir el sustrato de RNA al ribozima. A diferencia de los productos del ribozima en cabeza de martillo y de RNA similares, el producto del corte de la ribonucleasa P contiene un extremo 5′ fosfato. En todos estos casos, la estructura del RNA catalítico es esencial para la catálisis.

Finalmente, la estructura cristalográfica del ribosoma bacteriano ha revelado que éste también es un ribozima. El sitio activo del ribosoma se encuentra en la subunidad 50S. No hay grupos funcionales de la proteína suficientemente próximos para catalizar la formación del enlace peptídico, por lo que alguna parte de la cadena de RNA sirve de catalizador para la formación del enlace peptídico.

El descubrimiento de la catálisis por RNA ha alterado de manera notable nuestros conceptos sobre la evolución bioquímica y el abanico de posibilidades de la

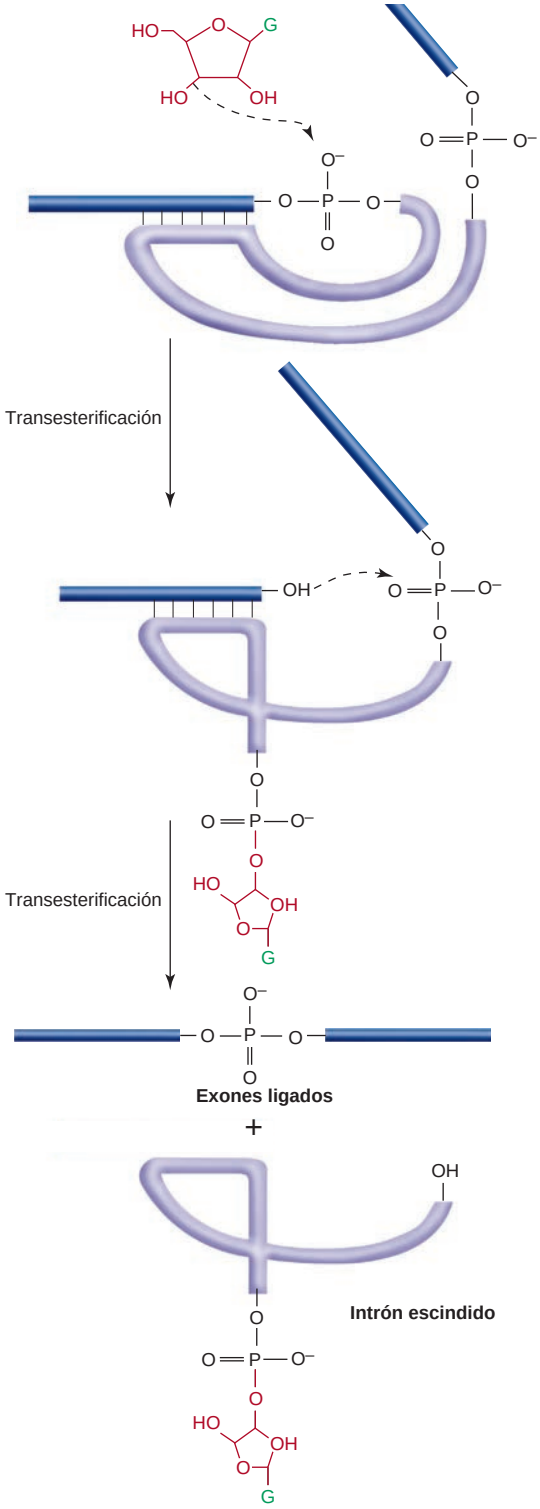


FIGURA 2.64
Mecanismo de autoempalme del precursor del rRNA de *Tetrahymena*.
Los dos exones del rRNA se representan de color azul oscuro. Las funciones catalíticas residen en el intrón, en púrpura. La función de corte y empalme requiere un nucleótido o nucleósido de guanina.
Adaptado de Cech, T. R. JAMA 260:308, 1988.

química celular. Primero, ahora aceptamos que el RNA puede actuar tanto como enzima como portador de información genética. Este hecho ha abierto la posibilidad de que los primeros organismos vivos estuvieran basados sólo en RNA, y que el DNA y las proteínas aparecieran más tarde. Este modelo se ha llamado a veces "**mundo de RNA**". En segundo lugar, muchos virus, incluidos algunos patógenos humanos, usan el RNA como soporte de la información genética, y algunos de estos RNA son catalíticos. Por lo tanto el RNA catalítico ofrece oportunidades para el descubrimiento de fármacos basados en RNA. Tercero, muchos pasos de trata-

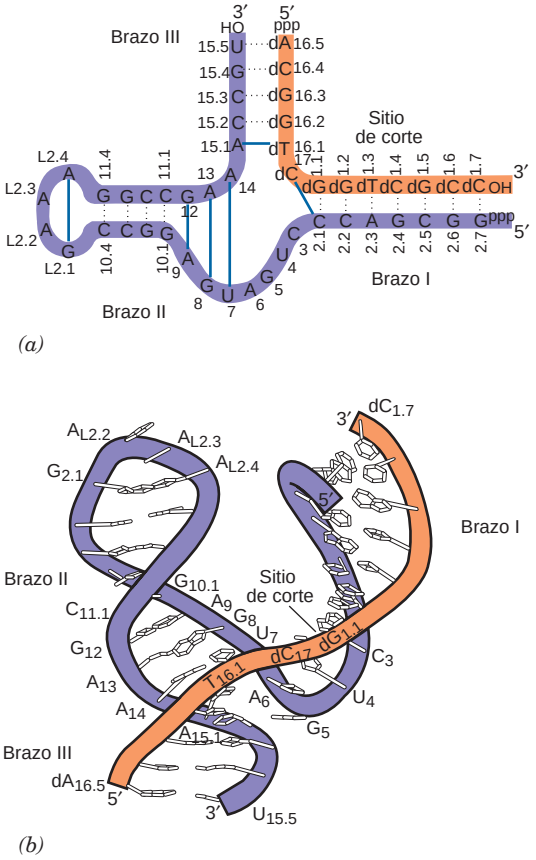


FIGURA 2.65
Estructura en "cabeza de martillo" de un RNA vírico.
(*a*) La estructura en "cabeza de martillo" de un RNA vírico autocortable. Esta molécula artificial está formada por el apareamiento de bases de dos moléculas de RNA. El corte en el punto indicado por la flecha en la hebra superior requiere el apareamiento con la hebra inferior. Los nucleótidos enmarcados representan la secuencia consenso presente en los RNA víricos capaces de introducir cortes en sus propias cadenas. (*b*) Plegamiento tridimensional del RNA autocatalítico en cabeza de martillo. Se indica la posición del enlace cortado. M indica el lugar de unión de un ion metálico. Las hélices II y III se apilan para formar una hélice aparentemente continua mientras que interacciones no Watson y Crick posicionan las bases no complementarias de la cabeza del martillo en una estructura en "giro de uridina", idéntica a las que se encuentran en el tRNA. *Parte (a) adaptado de Sampson, J. R., Sullivan, F. X., Behlen, L. S., DiRenzo, A. B. y Uhlenbeck, O.C.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *52:267, 1987; parte (b) adaptado de Pley, H. W., Flaherty, K. M. y McKay, D. B.* Nature *372:68, 1994.*

miento de la información en el corte y empalme del mRNA requieren componentes de RNA. Estos RNA también podrían estar actuando como catalizadores. Finalmente, es posible diseñar ribozimas que reconozcan y corten específicamente varios mRNA celulares. Al introducirlos en células en cultivo, estos ribozimas impiden eficazmente la expresión génica. De momento se trata sólo de una herramienta de investigación, pero ha sido una estrategia útil para determinar la función de genes cuya actividad metabólica era difícilmente deducible a partir de su secuencia.

Los RNA pueden formar sitios de unión para otras macromoléculas

La consideración del mundo de RNA ha llevado a un nuevo tipo de "bioquímica combinatoria" basada en el gran número de secuencias potenciales (4^N) que pueden obtenerse si se insertan las cuatro bases (A, C, G o U) al azar en cada una de las N posiciones de un ácido nucleico. El conjunto de secuencias de 25 nucleótidos sintetizadas químicamente al azar tendría $4^{25} = 10^{15}$ miembros potenciales. Sería de esperar que las moléculas individuales de esta amplia colección de RNA se plegaran en un conjunto de formas igualmente amplio. Un número tan alto de plegamientos diferentes haría posible encontrar algún miembro de esta colección con una interacción fuerte y específica con cualquier ligando, de manera similar a cómo el grupo de intrones de tipo I interacciona específicamente con los nucleótidos de guanina. Estos RNA de unión se denominan "**aptámeros**". Aunque una sola molécula en la población original sería demasiado escasa como para poder ser estudiada, el RNA aptámero puede ser seleccionado y replicado de manera preferente *in vitro*. En un caso, por ejemplo, pudo seleccionarse a partir de una población compleja un RNA capaz de distinguir la **teofilina** de la **cafeína** (Figura 2.66). La teofilina se utiliza en el tratamiento del asma crónico, pero la dosis debe controlarse cuidadosamente para evitar los efectos secundarios. La detección de la teofilina mediante química clínica convencional con anticuerpos es difícil debido a que la cafeína y la teofilina difieren en un solo grupo metilo; por lo tanto, los anticuerpos antiteofilina tienen una reacción cruzada considerable con la cafeína. Se han encontrado RNA

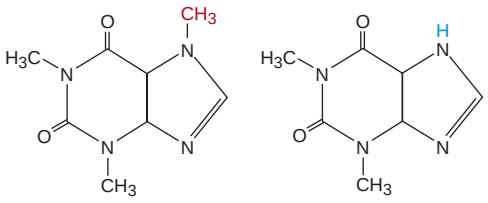


FIGURA 2.66
Estructuras de la teofilina y la cafeína.
Aunque estos compuestos difieren tan solo en un único grupo metilo, un RNA sintético específico puede unirse a la teofilina 10 000 veces más fuertemente que a la cafeína.

aptámeros que interaccionan con la teofilina 10 000 veces más fuertemente que con la cafeína. Esta tecnología ha sido aplicada para identificar nuevos ribozimas sintéticos y RNA con potencial terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

DNA

Bates, A. D. *DNA Topology.* Oxford, England: IRL Press, 1993.

Blackburn, G. M. y Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology,* 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1996.

Bouffler, S., Silver, A. y Cox, R. The role of DNA repeats and associated secondary structures in genomic instability and neoplasia. *Bioessays* 15:409, 1993.

Cech, T. R. Life at the end of the chromosome: telomeres and telomerase. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39:34, 2000.

Crothers, D. M. y Shakked, Z. DNA bending by adenine–thymine tracts. In: S. Neidle (Ed.), *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure.* New York: Oxford University Press, 1999, p. 455.

De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. y Weinstock, G. M. (Eds.). *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis.* New York: Chapman and Hall, 1998.

De Vries, J. E. y de Waal Malefyt, R. *Therapeutic Applications of Oligonucleotides.* New York: Demos Vermande, 1995.

Dickerson, R. E. DNA structure from A to Z. *Methods Enzymol.* 211:67, 1992.

Liu, M. A., Hilleman, M. R. y Kurth, R. (Eds). *DNA Vaccines: A New Era in Vaccinology.* New York: New York Academy of Sciences, 1995.

Feigon, J. A new DNA quadruplex. *Curr. Biol.* 3:611, 1993.

Hecht, S. M. (Ed.). *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids.* New York: Oxford University Press , 1996.

Kornberg, R. D. y Lorch, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98:285, 1999.

Laughlin, G., Murchie, A. I. H., Norman, D. G., Moore, M. H., Moody, P. C. E., Lilley, D. M. J. y Luisi, B. The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex. *Science* 265:520, 1994.

Leach, D. R. Long DNA palindromes, cruciform structures, genetic instability and secondary structure repair. *Bioessays* 16:893, 1994.

Lee, M. S. y Garrard, W. T. Positive DNA supercoiling generates a chromatin conformation characteristic of highly active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9675, 1991.

Murchie, A. I. H. y Lilley, D. M. J. Supercoiled DNA and cruciform structures. *Methods Enzymol.* 211:158, 1992.

Praseuth, D., Guieysse, A. L. y Helene, C. Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1489:181, 1999.

Rich, A. DNA comes in many forms. *Gene* 135:99, 1993.

Rich, A. Speculation on the biological roles of left-handed Z-DNA. En: S. S. Wallace, B. van Houten y Y. W. Kow (Eds.), *DNA Damage: Effects on DNA Structure and Protein Recognition.* New York: New York Academy of Sciences, 1994, p. 1.

Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure.* New York: Springer-Verlag, 1984.

Tenover, F. C. *DNA Probes for Infectious Diseases.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.

Ussery, D. W. y Sinden, R. R. Environmental influences on the *in vivo* level of intramolecular triplex DNA in *Escherichia coli. Biochemistry* 32:6206, 1993.

Van Holde, K. y Zlatanova, J. Unusual DNA structures, chromatin and transcription. *Bioessays* 16:59, 1994.

Wells, R. D. Unusual DNA structures. J. Biol. Chem. 263:1095, 1988.

Williamson, J. R. G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:703, 1994.

Yakubovskaya, E. A. y Gabibov, A. G. Topoisomerases: mechanisms of DNA topological alterations. *Mol. Biol.* 33:318, 1999.

RNA

Cundliffe, E. How antibiotic-producing microorganisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:207, 1989.

Dahlberg, A. E. The ribosome in action. *Science* 292:868, 2001.

Gesteland, R. F., Cech, T. y Atkins, J. F. (Eds.). *The RNA World,* 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. y Yarus, M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.* 64:763, 1995.

Ibba, M., Becker, H. D., Stathopoulos, C., Tumbula, D. L. y Söll, D. The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* 25:311, 2000

Lai, M. M. C. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu. Rev. Biochem.* 64:259, 1995.

Pace, N. R. y Brown, J. W. Evolutionary perspective on the structure and function of ribonuclease P, a ribozyme. *J. Bacteriol.* 177:1919, 1995.

Söll, D. y Rajbhandary, U. L. (Eds.). *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function.* Washington DC: American Society for Microbiology, 1994.

Westhof, E. y Fritsch, V. RNA folding: beyond Watson–Crick pairs. *Structure* 8:R55, 2000.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Un polinucleótido es un polímero en el que:
   A. los dos extremos son estructuralmente equivalentes.
   B. las unidades monoméricas están unidas por enlaces fosfodiéster.
   C. existen al menos 20 clases diferentes de monómeros susceptibles de ser utilizados.
   D. las unidades monoméricas no se pueden separar por hidrólisis.
   E. las bases púricas y pirimidínicas son las unidades repetitivas.

2. La mejor definición de endonucleasa es la de un enzima que hidroliza:
   A. un nucleótido exclusivamente del extremo 3′ de un oligonucleótido.
   B. un nucleótido de cualquiera de los extremos de un oligonucleótido.
   C. un enlace fosfodiéster localizado en el interior de un polinucleótido.
   D. un único enlace en una secuencia específica de nucleótidos.
   E. un enlace situado en posición distal (d) con respecto a la base que ocupa la posición 5′ del enlace.

3 Un palíndromo es una secuencia de nucleótidos del DNA que:
   A. está muy reiterada.
   B. es parte de los intrones de los genes eucarióticos.
   C. es un gen estructural.
   D. tiene simetría local y puede servir de sitio de reconocimiento para varias proteínas.
   E. tiene la información necesaria para conferir resistencia a los antibióticos a las bacterias.

4. En una doble hélice de DNA:
   A. las hebras individuales no son helicoidales.
   B. los puentes de hidrógeno se forman entre las bases púricas y pirimidínicas de la misma hebra.
   C. la adenina de una hebra forma puentes de hidrógeno con la timina de la hebra opuesta.
   D. los enlaces fosfodiéster están orientados hacia el interior de la hélice.
   E. la parte externa de la hélice no está cargada.

5 La hélice de la forma A del DNA difiere de la hélice B en todo lo siguiente EXCEPTO:
   A. la apariencia de los surcos mayor y menor.
   B. la inclinación de los pares de bases respecto el eje de la hélice.
   C. el grosor de la hélice.
   D. la pendiente de las bases.
   E. polaridad de las cadenas.

6. La hélice de DNA Z:
   A. tiene un número menor de pares de bases por vuelta que el DNA B.
   B. está favorecida por una secuencia de GC alternante.
   C. tiende a formarse en los extremos 3′ de los genes.
   D. su formación es inhibida por la metilación de las bases.
   E. es una conformación permanente del DNA.

7. Un patrón entremezclado en el DNA consiste en:
   A. secuencias altamente repetitivas.
   B. la fracción de DNA compuesta de DNA de copia única.
   C. secuencias Alu.
   D. bloques alternados de DNA de copia única y de DNA moderadamente repetitivo.
   E. bloques alternados de repeticiones cortas y largas entremezcladas.

8 Un nucleosoma:
   A. es una estructura regularmente repetida de DNA e histonas.
   B. tiene un núcleo de DNA con proteínas que lo envuelven.
   C. utiliza un solo tipo de histona por nucleosoma.
   D. está separado de un segundo nucleosoma por proteínas no histonas.
   E. tiene histonas en contacto con el surco mayor del DNA.

9. El RNA:
   A. incorpora bases púricas y pirimidínicas modificadas y no modificadas durante la transcripción.
   B. no posee estructura en doble hélice.
   C. presenta apilamiento de bases y pares de bases unidos por puentes de hidrógeno.
   D. normalmente contiene unos 65–100 nucleótidos.
   E. no tiene pares de bases de Watson y Crick.

10. Los ribozimas:
   A. son todas las partículas ribonucleoproteicas.
   B. son enzimas cuya actividad catalítica reside en las subunidades de RNA.
   C. desempeñan reacciones de automaduración pero no pueden considerarse auténticos catalizadores.
   D. requieren un cofactor proteico para formar un enlace peptídico.
   E. sólo actúan en la maduración del mRNA.

Preguntas 11 y 12: La práctica totalidad de los procesos en que participa el DNA requieren que éste interaccione con proteínas. La interacción con proteínas para la reparación, transcripción, recombinación y condensación de la cromatina, por ejemplo, depende de la estructura tridimensional local del DNA. Un compuesto antitumoral, el cisplatino, que se usa en el tratamiento de tumores de testículo, ovario, huesos y pulmón, es un complejo de platino tetracoordinado. Forma entrecruzamientos intracatenarios en el DNA, que producen una fuerte curvatura del DNA hacia el surco mayor. Procesos celulares tales como la transcripción y la muerte celular programada se ven afectados.

11. El DNA curvado:
   A. se da solamente en presencia de agentes externos tales como las drogas antitumorales.
   B. puede ser un elemento fundamental en la interacción entre secuencias del DNA y proteínas en procesos como la transcripción y la recombinación específica de sitio.
   C. aparece principalmente en presencia de DNA de triple cadena.
   D. requiere la presencia de repeticiones invertidas.
   E. aparece sólo en el DNA en forma Z.

12. El DNA curvado no es la única conformación poco frecuente del DNA. Otra forma del DNA son los complejos de cadena triple:
   A. generalmente aparece en regiones del DNA que no participan en la transcripción.
   B. contiene enlaces de hidrógeno de Hoogsteen.
   C. se caracteriza por una serie de bases púricas y pirimidínicas alternantes.
   D. se forma sólo intermolecularmente.
   E. adopta una conformación cruciforme.

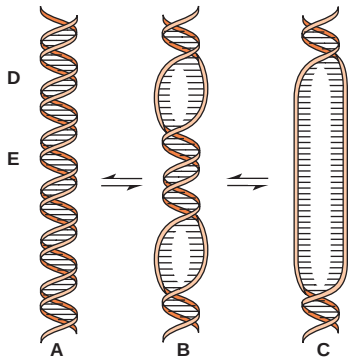
Preguntas 13 y 14: Los telómeros son secuencias repetitivas ricas en guanina en los extremos de los cromosomas eucarióticos lineales. Se acortan progresivamente con cada ciclo de división celular hasta alcanzar una longitud crítica que desencadena la muerte celular programada. La ribonucleoproteína telomerasa mantiene la longitud de los telómeros durante un número limitado de divisiones celulares y luego deja de expresarse, pero la mayoría de las células tumorales mantienen la actividad telomerasa. Cuanto mayor sea la actividad telomerasa tumoral peor es el pronóstico clínico. La inhibición selectiva de la telomerasa es una posible quimioterapia en proceso de experimentación. Algunos compuestos se unen selectivamente a la estructura en cuadrúplex de G en la telomerasa e inhiben su actividad. La actividad antitumoral de estos compuesto está siendo estudiada.

13. El DNA de cuadrúplex de G:
   A. es una estructura apilada de tetrámeros de guanina.
   B. está estabilizada por cationes metálicos.
   C. contiene bases unidas por enlaces de hidrógeno de Hoogsteen.
   D. puede contener disposiciones tanto paralelas como antiparalelas.
   E. todas las respuestas anteriores son correctas.

14. Otro enfoque en el tratamiento del cáncer consiste en el uso de compuestos que inhiban a las topoisomerasas. Las topoisomerasas:
   A. regulan el nivel de superhelicidad del DNA en las células.
   B. siempre rompen únicamente una hebra del DNA.
   C. pueden crear pero no eliminar el superenrollamiento.
   D. necesitan ATP.
   E. la subclase de las girasas introduce superhélices negativas en el DNA eucariótico.

Problemas

15. La figura que se muestra a continuación representa conformaciones del DNA (A, B, C) a diferentes temperaturas. ¿Qué conformación presenta la mayor densidad óptica relativa a 260 nm? ¿Qué región, D o E, tiene un mayor contenido de guanina y citosina? ¿Tendría algún efecto sobre la curva de "fusión" el aumento de la zona D en relación con la E?



16. Un DNA lineal con 15 vueltas ($T = 15$) y ninguna vuelta superhelicoidal se cierra para convertirlo en un DNA circular. En la situación A, el DNA se desenrolla 2 vueltas antes de cerrarlo. En la situación B, los extremos del DNA se fijan para que no puedan girar y se obliga a la molécula a formar un solo bucle en dirección contraria a las agujas del reloj, y los extremos se unen para formar una molécula de DNA circular. ¿Son A y B topológicamente equivalentes; es decir, son interconvertibles sin romper ningún enlace covalente?

RESPUESTAS

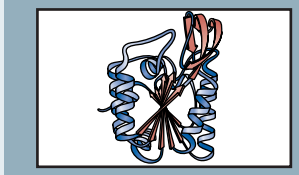
1. **B** Los azúcares fosforilados, no las bases, están unidos por enlaces fosfodiéster. A. La estructura de un polinucleótido posee un sentido intrínseco que no depende de si hay un 3′-OH o 5′-OH terminal esterificado. C y E: Sólo hay cuatro monómeros diferentes, y la unidad repetitiva es el nucleósido monofosfato. D: Las nucleasas hidrolizan los enlaces.
2. **C** Tanto A como B sirven para describir a las exonucleasas. D se refiere a una endonucleasa, pero solamente a un tipo específico, las endonucleasas de restricción, y no constituye, por tanto, una definición de tipo general. E: Tanto exo como endonucleasas presentan especificidad con respecto al enlace hidrolizado, por lo tanto ésta no es una definición adecuada de una endonucleasa.
3. **D** Un palídromo, por definición, se lee igual hacia delante y hacia atrás. Los segmentos palindrómicos cortos son reconocidos por diversas proteínas, entre las que se encuentran las endonucleasas de restricción. A: Es improbable porque sería incompatible con el reconocimiento específico. B es posible, pero no ha sido demostrado. C: Los genes tienen miles de pares de bases de longitud, mientras que los palíndromos son segmentos cortos. E: No es probable porque los palíndromos son demasiado cortos.
4. **C** Tiene como consecuencia la complementariedad de las cadenas. A: Las cadenas sencillas son hélices dextrógiras. B: Las bases en una monohebra interaccionan con las caras hidrofóbicas de sus anillos. D y E: Los grupos fosfato están cargados negativamente y en el exterior de la hélice.
5. **E** Las dos cadenas son siempre antiparalelas. A: La hélice A tiene un surco mayor más estrecho y profundo y un surco menor más ancho y superficial que la hélice B. B y D: Las bases en la hélice B son casi perpendiculares al eje de la hélice, mientras que en la hélice A están inclinadas. C: La hélice B es más delgada que la A.
6. **B** La secuencia alternante de purina–pirimidina es importante. A: El DNA Z es más largo y delgado que la forma B ya que tiene 12 pb por vuelta en lugar de 10. C: Es más probable encontrarla en el extremo 5′, de acuerdo con uno de sus papeles propuestos en la regulación de la transcripción. D: La metilación favorece la forma Z, en la cual los grupos metilo están resguardados del agua. E: La transición B → Z está influenciada por hechos tales como la metilación y la rotación de la G hacia la conformación *syn*.
7. **D** A, B: Son tipos diversos de DNA, pero no forman un patrón. C, E: Alu es un tipo de repetición corta entremezclada. Las repeticiones cortas y largas entremezcladas son dos clases de DNA moderadamente repetitivo.
8. **A** La estructura en "collar de cuentas" se denomina polinucleosoma. B: Las histonas forman el núcleo con el DNA en el exterior. C: Están presentes los cinco tipos de histona —cuatro en interior y una en el exterior. D: La conexión entre los nucleosomas es de DNA. E: Las proteínas que regulan la expresión génica y otras actividades se unen al surco mayor. Las histonas se unen al surco menor.
9. **C** El apilamiento estabiliza las hélices de cadena sencilla. Las regiones plegadas de la estructura tienen pares de bases unidos por enlaces de hidrógeno. A: Sólo las cuatro bases A, G, U y C son incorporadas durante la transcripción. B: Aunque consistente en una sola cadena, el RNA posee una elevada proporción de estructura secundaria y terciaria. D: Sólo el tRNA sería tan pequeño; el tamaño puede ser superior a 6000 nucleótidos. E: Se da en las regiones helicoidales intracatenarias.
10. **B** Los ribozimas son partículas muy especializadas. A: Véase el comentario anterior. C: Una de las cuatro clases, la RNasa P, cataliza una reacción de corte. D: La cristalografía de rayos X ha mostrado que no hay una cadena de aminoácidos suficientemente cercana para catalizar la formación del enlace peptídico. E: Los ribozimas han sido implicados en la maduración del RNA ribosómico y del tRNA.
11. **B** El DNA curvado puede ser un lugar de reconocimiento de proteínas específicas. A, D: El DNA curvado aparece naturalmente como fragmentos de cuatro o seis adenosinas separadas por espaciadores o se induce por interacción con ciertas proteínas. C: El DNA curvado es de doble cadena. E: El DNA Z no tiene surco mayor y la curvatura es hacia el surco mayor.
12. **B** El apareamiento de Hoogsteen en los tripletes TAT y GGC es responsable del mantenimiento de la tercera hebra en el surco mayor. A: Se encuentran a menudo en regiones implicadas en la regulación génica. C: La secuencia requerida es un fragmento de homopurina. D: También se pueden formar intramolecularmente, desplegando y volviendo a plegar el DNA. E: Un cruciforme es una conformación alternativa del DNA pero no implica una tercera hebra.
13. **E** A, C: Las guaninas se mantinen juntas por enlaces de Hoogsteen y se denominan cuartetos de G. B: El sodio y el potasio son más efectivos porque encajan en el centro del cuarteto y se unen a los oxígenos de la guanina. D: Las estructuras paralelas se pre-

sentan cuando interaccionan cuatro polinucleótidos separados y las estructuras antiparalelas predominan cuando un solo polinucleótido suministra dos o más cadenas.

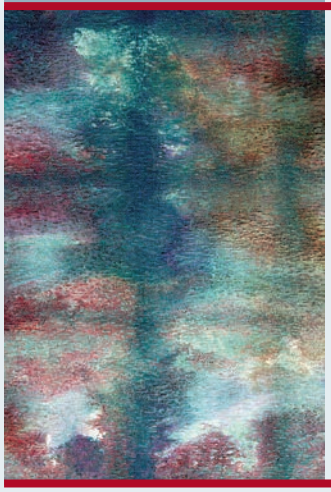
14. **A** La topoisomerasa I relaja el DNA y la topoisomerasa II genera superenrollamientos. El balance entre estas dos actividades opuestas mantiene el nivel adecuado de superhelicidad. B: La topoisomerasa I rompe una de las cadenas, pero la topoisomerasa II corta las dos. C: La topoisomerasa I elimina las vueltas superhelicoidales. D: La topoisomerasa II utiliza ATP, la topoisomerasa I no lo utiliza. E: Las girasas se encuentran sólo en las bacterias.

15. C tiene la densidad óptica relativa más elevada y también representa la conformación a la temperatura más alta. La densidad óptica aumenta a medida que disminuye el apilamiento de las bases. La desnaturalización aumenta con la temperatura. E tiene un contenido de G-C mayor, pues está menos desnaturalizada que D a la temperatura intermedia. T_m es el punto medio de la transición entre la doble cadena y las cadenas separadas. Aumentar la extensión de D aumentaría el contenido de A-T en relación con el de G-C, y, por lo tanto, disminuiría la temperatura necesaria para separarar las hebras.

16. Para ser topológicamente equivalentes, las dos conformaciones deben tener el mismo número de enlace (L). $L = T + W$ (número de retorcimiento, correspondiente al número de vueltas superhelicoidales). En la situación A, $L = 13 + 0 = 13$. En la situación B, $L = 15 - 1 = 14$. A y B no son equivalentes porque tienen diferente número de enlace.



3



PROTEÍNAS I: COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA

Richard M. Schultz y Michael N. Liebman

3.1 PAPELES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS EN LOS SERES HUMANOS 94

3.2 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS 95

- Las proteínas son polímeros de α-aminoácidos 95
- Los aminoácidos comunes tienen una estructura general 95
- La cadenas laterales definen la naturaleza química y la estructura de los diferentes aminoácidos 95
- Los aminoácidos tienen un centro asimétrico 98
- Los aminoácidos se polimerizan en péptidos y proteínas 98
- La cistina es un aminoácido derivado 100

3.3 CARGA Y PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS Y LAS PROTEÍNAS 101

- Los grupos ionizables de los aminoácidos y las proteínas son fundamentales para su función biológica 101
- Puede calcularse la forma iónica de un aminoácido o una proteína a un pH determinado 102
- Titulación de un ácido monoamino monocarboxílico: Determinación del pH isoeléctrico 102
- Titulación de un ácido monoamino dicarboxílico 103
- Relación general entre el pH y la carga de los aminoácidos y proteínas 104
- Los aminoácidos y las proteínas pueden separarse según sus valores de p*I* 105
- Las cadenas laterales de los aminoácidos tienen propiedades polares o apolares 106
- Los aminoácidos experimentan un gran número de reacciones químicas 108

3.4 ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS PROTEÍNAS 109

3.5 NIVELES SUPERIORES DE ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS 112

- Las proteínas tienen estructura secundaria 113
  - La estructura α-helicoidal 114
  - La estructura β 115
- Motivos estructurales y plegamientos proteicos 115
- Las proteínas forman estructuras tridimensionales: estructura terciaria 116
- La bioinformática relaciona la estructura y la función de los productos génicos proteicos 117
- Estructuras con plegamientos homólogos están formadas a menudo por secuencias de aminoácidos no homólogas 119
- La estructura cuaternaria consiste en la asociación específica y no covalente de varias cadenas polipeptídicas 121

3.6 OTROS TIPOS DE PROTEÍNAS 121

- El colágeno, la elastina, la α-queratina y la tropomiosina son proteínas fibrosas 121
  - Distribución del colágeno en el cuerpo humano 121
  - Composición de aminoácidos del colágeno 122
  - Secuencia de aminoácidos del colágeno 122
  - Estructura del colágeno 123
  - Formación de enlaces covalentes cruzados en el colágeno 125
  - La elastina es una proteína fibrosa con entrecruzamientos generados por al-lisina 125
  - α-Queratina y tropomiosina 126
- Las lipoproteínas plasmáticas son complejos de lípidos y proteínas 127
- Las glucoproteínas contienen glúcidos unidos covalentemente 129
  - Tipos de enlaces covalentes glúcido-proteína 131

3.7 PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS EN ESTRUCTURAS ÚNICAS A PARTIR DE ESTRUCTURAS ESTADÍSTICAS: ESTABILIDAD PROTEICA 132

- El problema del plegamiento de las proteínas: una posible ruta 132
- Las proteínas chaperona pueden favorecer el proceso de plegamiento de las proteínas 133
- Las fuerzas no covalentes provocan el plegamiento de las proteínas y contribuyen a su estabilidad. 135
  - Fuerzas de interacción hidrofóbica 135
  - Puentes de hidrógeno 137

Interacciones electrostáticas 137
Fuerzas de dispersión de van der Waals-London 137
La desnaturalización de las proteínas provoca la pérdida de la estructura nativa 138

3.8 ASPECTOS DINÁMICOS DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS 139

3.9 MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y LA ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS 140

Separación de proteínas basada en la carga 140
Electroforesis capilar 141
Separación de proteínas basada en la masa molecular o en el tamaño 142
Ultracentrifugación: definición del coeficiente de Svedberg 142
Cromatografía de exclusión molecular 142
Electroforesis sobre gel de poliacrilamida en presencia de un detergente 143
Las técnicas cromatográficas de HPLC separan aminoácidos, péptidos y proteínas 143
Cromatografía de afinidad 143
Metodología para la purificación de proteínas 144
Las técnicas de la proteómica permiten determinar todas las proteínas expresadas en una célula o en un tejido en un solo ensayo 144
Determinación de la composición de aminoácidos de una proteína 146
Técnicas para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína 146
Para determinar la estructura tridimensional de las proteínas se utilizan técnicas de difracción de rayos X 148
Métodos espectroscópicos para el análisis de la estructura y la función de las proteínas 150
Espectroscopia de luz ultravioleta 150
Espectroscopia de fluorescencia 151
Espectroscopia de dispersión rotatoria óptica y dicroísmo circular 152
Resonancia magnética nuclear 152

BIBLIOGRAFÍA 154

PREGUNTAS 155

RESPUESTAS 156

APLICACIONES CLÍNICAS

3.1 Las proteínas plasmáticas en el diagnóstico médico 107
3.2 Diferencias en la estructura primaria de las insulinas utilizadas en el tratamiento de la diabetes mellitus 111
3.3 En la anemia falciforme se produce una mutación no conservadora 112
3.4 Síntomas de las enfermedades relacionadas con una síntesis anormal de colágeno 121
3.5 Hiperlipidemias 127
3.6 Hipolipoproteinemias 128
3.7 Hemoglobina glucosilada HbA_{1c} 132
3.8 Las proteínas como agentes infecciosos: Las encefalopatías espongiformes (TSE) transmisibles humanas 134
3.9 Uso del análisis de aminoácidos en el diagnóstico médico 146

3.1 PAPELES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS EN LOS SERES HUMANOS

Las proteínas desempeñan una amplia variedad de funciones esenciales en los mamíferos. Entre las funciones dinámicas se encuentran la catálisis de las transformaciones químicas, el transporte, el control metabólico y la contracción. En cuanto a sus funciones estructurales, las proteínas proporcionan la matriz para los tejidos óseo y conjuntivo que dan estructura y forma al organismo humano.

Un grupo importante de proteínas dinámicas son los enzimas, que catalizan reacciones químicas, convirtiendo el sustrato en producto en el centro activo del enzima. De los millares de reacciones químicas que tienen lugar en los organismos vivos, casi todas requieren un catalizador enzimático específico para que tengan lugar a una velocidad compatible con la vida. Las características de cualquier célula se basan en su química particular, que, a su vez, está determinada por su composición enzimática específica. Numerosos caracteres genéticos se manifiestan a través de la síntesis de enzimas, que catalizan reacciones que determinan el fenotipo. Muchas enfermedades genéticas son provocadas por la alteración de los niveles de síntesis de enzimas o por cambios específicos en su secuencia de aminoácidos. Otra función importante de las proteínas es el transporte. Los ejemplos concretos que se tratan con mayor detalle en este texto son la hemoglobina y la mioglobina, que transportan oxígeno en la sangre y en el músculo, respectivamente. La transferrina transporta hierro en la sangre. Otras proteínas importantes actúan fijando y transportando hormonas esteroides a través de la sangre, desde el lugar de síntesis hasta el lugar de acción. Muchos fármacos y compuestos tóxicos son transportados unidos a proteínas. Las proteínas participan en los mecanismos contráctiles. La miosina y la actina actúan en la contracción muscular.

Las proteínas desempeñan un papel de protección mediante una combinación de funciones dinámicas. Las inmunoglobulinas y el interferón son proteínas que protegen al organismo contra las infecciones bacterianas o víricas. La fibrina detiene la pérdida de sangre producida por una lesión del sistema vascular.

Muchas hormonas son proteínas o péptidos. Entre las hormonas proteicas se encuentran la insulina, la tirotropina, la somatotropina (hormona del crecimiento),

la prolactina, la hormona luteinizante y la hormona estimulante del folículo. Muchas hormonas polipeptídicas son de pequeña masa molecular (< 5000) y se denominan péptidos. En general, el término **proteína** se emplea para moléculas compuestas por más de 50 aminoácidos, mientras que el término **péptido** se utiliza para moléculas de menos de 50 aminoácidos. Hormonas peptídicas importantes son la hormona adrenocorticotropa, la hormona antidiurética, el glucagón y la calcitonina.

Las proteínas controlan y regulan la transcripción y traducción génicas. Entre estas se encuentran las histonas, estrechamente asociadas al DNA, los factores de transcripción represores y potenciadores, que controlan la transcripción génica, y las proteínas que son parte de las partículas de RNA heteronuclear y de los ribosomas.

Las proteínas estructurales actúan como "ladrillo y mortero". En este grupo de proteínas se encuentran el colágeno y la elastina, que forman la matriz del hueso y de los ligamentos, y que proporcionan resistencia estructural y elasticidad a los órganos y al sistema vascular. La α-queratina está presente en el cabello y en otros tejidos epidérmicos.

La comprensión del funcionamiento tanto normal como patológico del organismo de los mamíferos depende del conocimiento de las propiedades de las proteínas.

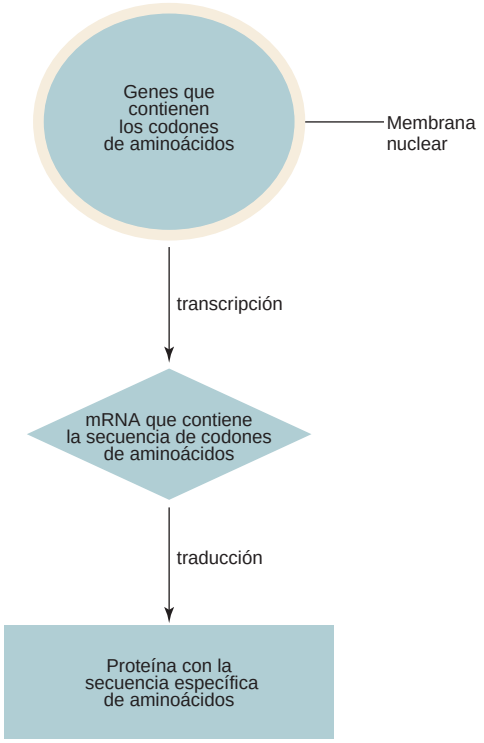


FIGURA 3.1
La información genética se transcribe desde una secuencia de DNA al mRNA y después se traduce a la secuencia de aminoácidos de una proteína.

3.2 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son polímeros de α-aminoácidos

Es sorprendente constatar que todos los diferentes tipos de proteínas se sintetizan como polímeros de sólo 20 aminoácidos. Los **aminoácidos comunes** se definen como aquellos para los que existe al menos un codón específico en el código genético. La transcripción y la traducción del código del DNA dan lugar a la polimerización de aminoácidos en una secuencia lineal específica, característica de cada proteína (Figura 3.1). Las proteínas también pueden contener **aminoácidos derivados**, que se forman a partir de un aminoácido común, normalmente mediante una reacción facilitada por un enzima, después de que el aminoácido se haya incorporado a la estructura proteica. Ejemplos de aminoácidos derivados son la cistina (véase la p. 100), la desmosina y la isodesmosina, que se encuentran en la elastina, la hidroxiprolina y la hidroxilisina presentes en el colágeno y el γ-carboxiglutamato que se encuentra en la protrombina.

Los aminoácidos comunes tienen una estructura general

Los aminoácidos comunes tienen la estructura general mostrada en la Figura 3.2. Tienen en común un átomo de carbono central *alfa* (α), al que están unidos covalentemente un grupo ácido carboxílico, un grupo amino y un átomo de hidrógeno. Además, al átomo de carbono α se le une un grupo químico específico, denominado cadena lateral y representado por R, que es diferente para cada uno de los 20 aminoácidos comunes. La estructura de la Figura 3.2 muestra la forma ionizada de un aminoácido común en disolución a pH 7. El grupo α-amino está protonado en su forma de ion amonio; el grupo ácido carboxílico se encuentra en su forma desprotonada o de ión carboxilato.

Las cadenas laterales definen la naturaleza química y la estructura de los diferentes aminoácidos

Las estructuras de los aminoácidos comunes se muestran en la Figura 3.3. Los alquil aminoácidos tienen cadenas laterales alquilo y comprenden la glicina, la alanina, la valina, la leucina y la isoleucina. La **glicina** tiene la estructura más sencilla, con R = H. La **alanina** contiene un grupo metilo (CH_3—). La **valina** tiene un grupo R isopropilo (Figura 3.4). Los grupos R de la leucina y la isoleucina son grupos butilo, que son isómeros estructurales uno del otro. En la **leucina**, la ramificación de la cadena lateral de isobutilo se encuentra en el carbono *gamma* (γ) y en la isoleucina la ramificación se encuentra en el carbono *beta* (β).

Los aminoácidos aromáticos son la fenilalanina, la tirosina y el triptófano. El grupo R de la **fenilalanina** contiene un anillo bencénico; la **tirosina**, un grupo fenólico; y el **triptófano**, la estructura heterocíclica indol. En los tres casos la porción aromática está unida al carbono α a través de un carbono metilénico (—CH_2—) (Figura 3.3).

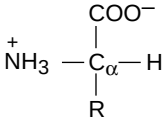
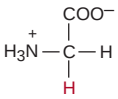


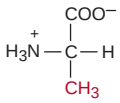
FIGURA 3.2
Estructura general de los aminoácidos comunes.

Monoamino, monocarboxílico

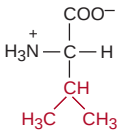
Sin sustituir



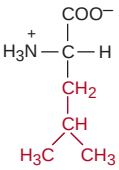
Glicina



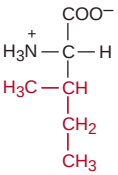
L-Alanina



L-Valina

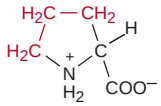


L-Leucina



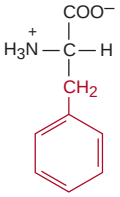
L-Isoleucina

Heterocíclicos

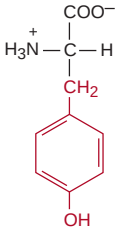


L-Prolina

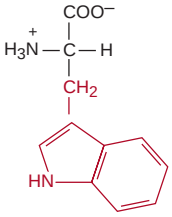
Aromáticos



L-Fenilalanina

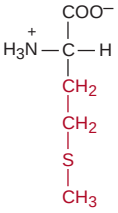


L-Tirosina



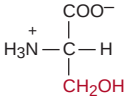
L-Triptófano

Tioéter

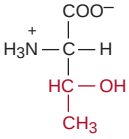


L-Metionina

Hidroxi

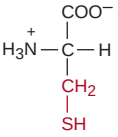


L-Serina



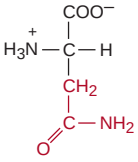
L-Treonina

Mercapto

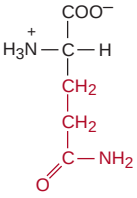


L-Cisteína

Carboxamida

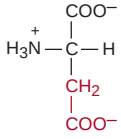


L-Asparagina

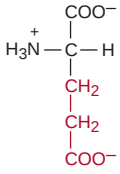


L-Glutamina

Monoamino, dicarboxílico

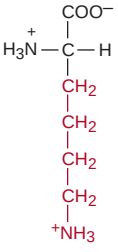


L-Aspartato

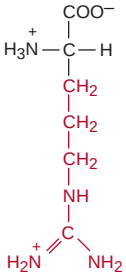


L-Glutamato

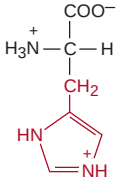
Diamino, monocarboxílico



L-Lisina



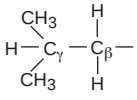
L-Arginina



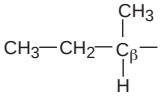
L-Histidina

FIGURA 3.3
Estructuras de los aminoácidos comunes.
Las formas cargadas son las que están presentes a pH 7,0.

Isopropilo, grupo R de la valina



Isobutilo, grupo R de la leucina



Isobutilo, grupo R de la isoleucina

FIGURA 3.4
Cadenas laterales alquilo de la valina, leucina e isoleucina.

Grupo R del aspartato Grupo R del glutamato

FIGURA 3.5
Cadenas laterales del aspartato y el glutamato.

Los aminoácidos que contienen azufre son la cisteína y la metionina. La cadena lateral de la **cisteína** es un grupo tiometilo ($HSCH_2$—). En la **metionina**, la cadena lateral es un metil etil tiol éter ($CH_3SCH_2CH_2$—).

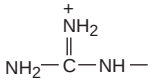
Los dos aminoácidos que contienen grupos hidroxilo (alcohólicos) son la serina y la treonina. La cadena lateral de la **serina** es un hidroximetilo ($HOCH_2$—). En la **treonina** un etanol está conectado al carbono α del aminoácido a través del carbono que contiene el hidroxilo sustituyente, dando lugar a una estructura de alcohol secundario (CH_3—CHOH—CH_α—).

La **prolina** es única, en cuanto que incorpora el grupo α-amino en su cadena lateral, y se clasifica más adecuadamente como un α-iminoácido, ya que su α-amina es una amina secundaria, con su nitrógeno α formando dos enlaces covalentes con carbonos (uno con el carbono α y otro con el carbono de la cadena lateral), en lugar de una amina primaria. La incorporación del nitrógeno α-amino a un anillo de cinco átomos restringe en la prolina la libertad de rotación alrededor del enlace —N_α—C_α— a un ángulo rotacional específico, que impide la participación de la prolina en algunas conformaciones de la cadena polipeptídica.

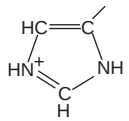
Los aminoácidos tratados hasta el momento contienen cadenas laterales sin carga a pH fisiológico. Los **ácidos monoamino dicarboxílicos** contienen un grupo ácido carboxílico en su cadena lateral. El **aspartato** contiene un grupo ácido carboxílico separado del carbono α por un carbono metilénico (—CH_2—) (Figura 3.5). En el **glutamato** (Figura 3.5), el grupo ácido carboxílico está separado del carbono α por dos átomos de carbono metilénicos (—CH_2—CH_2—) (Figura 3.2). A pH fisiológico, los grupos ácido carboxílico de la cadena lateral están desprotonados y, por lo tanto, cargados negativamente. Los **ácidos monocarboxílicos dibásicos** incluyen la lisina, la arginina y la histidina (Figura 3.3). En estas estructuras, el grupo R contiene uno o dos átomos de nitrógeno que actúan de base al unir un protón. La cadena lateral de la **lisina** es la *N*-butilamina. En la **arginina**, la cadena lateral contiene un grupo guanidinio (Figura 3.6) separado del carbono α por tres átomos de carbono metilénicos. Tanto el grupo guanidinio de la arginina como el grupo ε-amino de la lisina están protonados a pH fisiológico (pH $\sim$ 7) y, por lo tanto, en su forma cargada positivamente. En la **histidina**, la cadena lateral contiene una estructura heterocíclica de cinco átomos denominada imidazol (Figura 3.6). El pK'_a del grupo imidazol es aproximadamente 6,0 en agua; las disoluciones fisiológicas contienen concentraciones relativamente elevadas tanto de la forma básica (imidazol) como de la ácida (imidazolio) de la cadena lateral de la histidina (véase la Sección 3.3).

La **glutamina** y la **asparagina** son análogos estructurales del ácido glutámico y del ácido aspártico, con los grupos carboxílicos de su cadena lateral amidados. No obstante, existen codones en el DNA para la glutamina y la asparagina diferentes de los del ácido glutámico y el ácido aspártico. Las cadenas laterales amídicas de la glutamina y la asparagina no se pueden protonar y permanecen sin carga a pH fisiológico.

Para representar la secuencia de aminoácidos de las proteínas se han definido abreviaturas de tres letras y de una letra para los aminoácidos comunes (Tabla 3.1). Estas abreviaturas están aceptadas universalmente y se utilizarán a lo largo de este libro. Las abreviaturas de tres letras de los ácidos aspártico (Asp) y glutámico (Glu) no se han de confundir con las de la asparagina (Asn) y la glutamina (Gln). En la determinación experimental de los aminoácidos de una proteína mediante procedimientos químicos, es difícil distinguir entre Asn y Asp, o entre Gln y Glu, debido a que los grupos amida de la cadena lateral en Asn y Gln se hidrolizan, generando Asp y Glu (véase la Sección 3.9). La utilización del símbolo Asx, para Asp o Asn, y Glx, para Glu o Gln tiene en cuenta esta ambigüedad. Se utiliza un sistema parecido para simbolizar Asp o Asn y Glu o Gln con las abreviaturas de una letra.



Grupo guanidinio (forma cargada) de la arginina



Grupo imidazolio de la histidina

FIGURA 3.6
Grupos guanidinio e imidazolio de la arginina y la histidina.

TABLA 3.1 Abreviaturas para los aminoácidos.

Aminoácido	*Abreviatura*	
	Tres letras	*Una letra*
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Asparagina o aspartato	Asx	B
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Glutamato	Glu	E
Glutamina o glutamato	Glx	Z
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

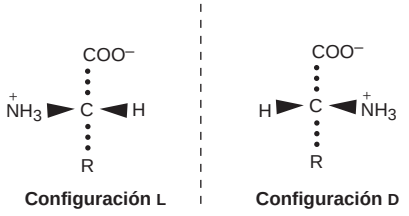


FIGURA 3.7
Configuración absoluta de un aminoácido.

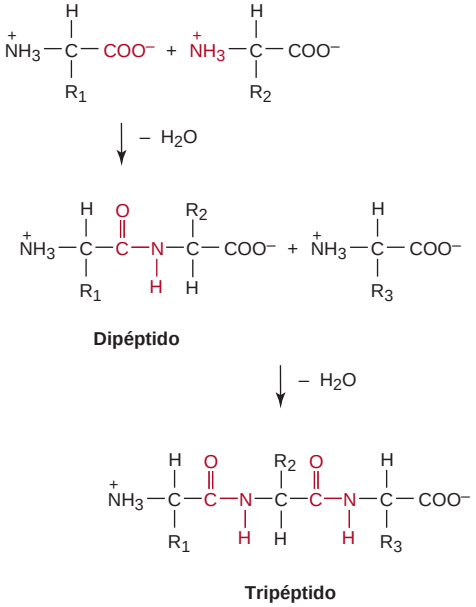


FIGURA 3.8
Formación del enlace peptídico.

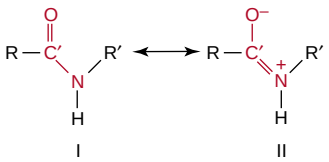


FIGURA 3.9
Estructuras electrónicas isómeras del enlace peptídico.

Los aminoácidos tienen un centro asimétrico

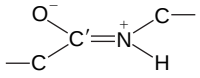
Los aminoácidos comunes representados en la Figura 3.2 tienen cuatro sustituyentes (R, H, COO^-, NH_3^+) unidos covalentemente al carbono α. Un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes dispuestos en **configuración tetraédrica** es asimétrico, por lo que existen dos formas enantioméricas. Por lo tanto, todos los aminoácidos muestran isomería óptica excepto la glicina, en la que R = H, con lo cual dos de los cuatro sustituyentes del carbono α son hidrógeno. La configuración absoluta de un aminoácido se muestra en la Figura 3.7, utilizando la proyección de Fischer para mostrar la posición en el espacio de los sustituyentes del carbono α dispuestos en forma tetraédrica. El grupo α-COO^- está dirigido hacia arriba y por detrás del plano de la página, y el grupo R está dirigido hacia abajo y también por detrás del plano de la página. Los grupos α-H y el α-NH_3^+ están dirigidos hacia el lector. Un aminoácido mantenido en esta posición proyecta su grupo α-NH_3^+ hacia la derecha o hacia la izquierda del átomo de carbono α. Por convención, si el α-NH_3^+ se proyecta hacia la izquierda, el aminoácido tiene la **configuración absoluta** L. Su enantiómero óptico, con el α-NH_3^+ proyectado hacia la derecha, tiene una **configuración absoluta** D. En las proteínas de mamíferos sólo se encuentran aminoácidos con configuración L. Las designaciones L y D hacen referencia a la capacidad de girar el plano de la luz polarizada hacia la izquierda (L, levo) o hacia la derecha (D, dextro). Dado que los aminoácidos de las proteínas son asimétricos, las proteínas también muestran propiedades asimétricas.

Los aminoácidos se polimerizan en péptidos y proteínas

En las células, la polimerización de los 20 aminoácidos comunes para formar cadenas polipeptídicas está catalizada por enzimas y está asociada a los ribosomas (Capítulo 6). Desde un punto de vista químico, esta polimerización es una reacción de deshidratación (Figura 3.8). El grupo α-carboxílico de un aminoácido con cadena lateral R_1 forma un **enlace peptídico** covalente con el grupo α-amino de otro aminoácido con cadena lateral R_2 por eliminación de una molécula de agua. El **dipéptido** (dos residuos aminoácidos unidos por un solo enlace peptídico) puede formar entonces un segundo enlace peptídico con el α-amino de un tercer aminoácido (R_3) a través de su grupo ácido carboxílico terminal, generando un tripéptido (Figura 3.8). La repetición de este proceso genera un **polipéptido**, o proteína, con una secuencia de aminoácidos específica (R_1-R_2-R_3-R_4- $\cdots$ R_n). Esta es la **estructura primaria** de la proteína, y está predeterminada por la secuencia de nucleótidos de su gen (véase el Capítulo 6). Esta estructura primaria única es la que hace posible que una cadena polipeptídica se pliegue con una estructura tridimensional específica que confiere a la proteína sus propiedades químicas y fisiológicas.

El enlace peptídico puede representarse como dos **isómeros de resonancia** (Figura 3.9). En la estructura I hay un doble enlace entre el carbono del carbonilo y el oxígeno del carbonilo (C′═O), mientras que el enlace entre el carbono del carbonilo y el nitrógeno (C′—N) es sencillo. En la estructura II, el enlace entre carbono y oxígeno del carbonilo es sencillo (C′—O—) y el enlace entre el carbono del carbonilo y el nitrógeno es doble (C′═N). En la estructura II, el oxígeno tiene una carga negativa y el nitrógeno una carga positiva. Los enlaces peptídicos son en realidad híbridos de resonancia de estas dos estructuras de isómeros electrónicos. El enlace entre el carbono del carbonilo y el nitrógeno presenta un 50% de carácter de doble enlace. La existencia del enlace híbrido se apoya en mediciones espectroscópicas y en estudios de difracción de rayos X, que muestran que la longitud (1,33 Å) del enlace peptídico entre el carbono del carbonilo y el nitrógeno está aproximadamente a mitad de camino de la determinada para enlaces C′—N sencillos (~1,45 Å) y la de un doble enlace C′═N (~ 1,25 Å).

Una consecuencia del carácter de doble enlace parcial es la ausencia de rotación alrededor del enlace entre el carbono del carbonilo y el nitrógeno del enlace peptídico a temperaturas fisiológicas. Todos los átomos unidos a C′ y N se encuentran en un mismo plano.



Por lo tanto, una cadena polipeptídica es un polímero que consiste en enlaces peptídicos planos conectados por los átomos de carbono α. El carbono α conecta los enlaces peptídicos mediante enlaces sencillos que permiten la rotación de los planos peptídicos adyacentes uno con respecto al otro. Cada **residuo aminoácido** aporta un carbono α, dos enlaces sencillos y un enlace peptídico a la cadena polipeptídica (Figura 3.10). El término residuo se refiere a los átomos aportados por un aminoácido a la cadena del polipéptido, incluidos los átomos de la cadena lateral.

El enlace peptídico de la Figura 3.11*a* muestra una **configuración *trans*** de sus átomos de oxígeno (O) y de hidrógeno (H). Esta es la configuración más estable, con los dos grupos de la cadena lateral (R y R′) también en *trans*. En la **configuración *cis*** (Figura 3.11*b*) los dos grupos de las cadenas laterales se encuentran en el mismo lado del enlace C′═N, lo que da lugar a fuerzas estéricas de repulsión desfavorables entre los grupos R. En consecuencia, los enlaces peptídicos que se encuentran en las proteínas están siempre en la conformación *trans*, excepto donde hay residuos de prolina. En la prolina, la cadena lateral está unida a su grupo α-amino, y los enlaces en *trans* y en *cis* con el α-imino de la prolina tienen aproximadamente la misma energía. La configuración del enlace peptídico de la prolina dependerá específicamente de las fuerzas generadas por la estructura tridimensional plegada única de la molécula de proteína.

Una de las mayores cadenas polipeptídicas naturales en el hombre es la de la apolipoproteína B-100, que contiene 4536 residuos aminoácidos. Sin embargo, la longitud de la cadena por sí sola no determina la función de un polipéptido. Muchos péptidos pequeños que contienen menos de 10 aminoácidos realizan impor-

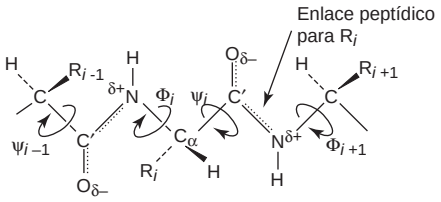
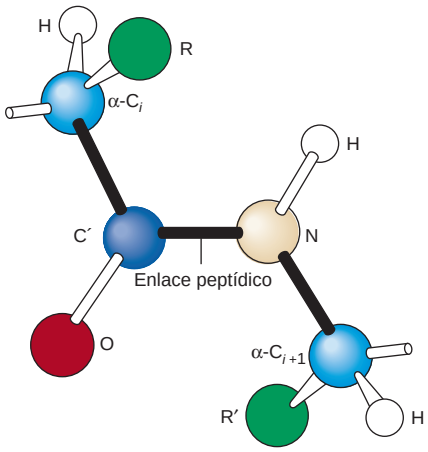
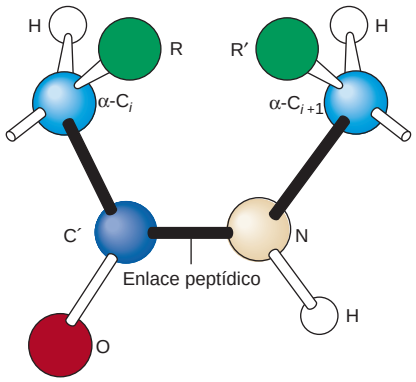


FIGURA 3.10
Residuo aminoácido dentro de una cadena polipeptídica.
Cada residuo de un polipéptido aporta dos enlaces sencillos y un enlace peptídico a la cadena. Los enlaces sencillos se encuentran entre los átomos C_α y C′ del carbonilo y entre los átomos C_α y N. Véase la p. 113 para la definición de ϕ y ψ.



(a) Configuración *trans*



(b) Configuración *cis*

FIGURA 3.11
(*a*) Enlace peptídico *trans*, y (*b*) el poco frecuente enlace peptídico *cis*. C′—N tiene carácter de doble enlace parcial.

TABLA 3.2 Algunos ejemplos de péptidos biológicamente activos.

Secuencia de aminoácidos	*Nombre*	*Función*
1 3 pyroGlu-His-Pro(NH_2)[a]	Hormona liberadora de la tirotropina	Secretado por el hipotálamo; hace que la hipófisis libere la hormona tirotrópica
1 9 H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly(NH_2)[b,d] S—S	Vasopresina (hormona antidiurética)	Secretada por el lóbulo posterior de la hipófisis; hace que el riñón retenga agua de la orina
1 5 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	Encefalina (metionina)	Péptido de tipo opiáceo encontrado en el cerebro que inhibe la sensación de dolor
1 10 pyroGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu- 11 17 Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe(NH_2)[c,d] SO_3	Pequeña gastrina (humana)	Hormona secretada por las células de la mucosa del estómago que induce la secreción de ácido por las células parietales del estómago
1 10 H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr- 11 20 Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln- 21 29 Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH	Glucagón (bovino)	Hormona pancreática implicada en la regulación del metabolismo de la glucosa
1 8 H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	Angiotensina II (equina)	Péptido presor o hipertensivo; también estimula la liberación de aldosterona por la glándula suprarrenal
1 9 H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH	Bradiquinina plasmática (bovina)	Péptido vasodilatador
1 10 H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met(NH_2)[d]	Sustancia P	Neurotransmisor

[a] El Glu NH_2-terminal se encuentra en la forma piro en la que el COOH en γ está unido covalentemente a su α-NH_2 vía enlace amida; el aminoácido COOH terminal está amidado y por tanto no está libre.
[b] La cisteína-1 y la cisteína-6 están unidas formando un enlace disulfuro dentro del nonapéptido.
[c] La Tyr-12 está sulfonada sobre su OH fenólico de la cadena lateral.
[d] El aminoácido COOH terminal está amidado.

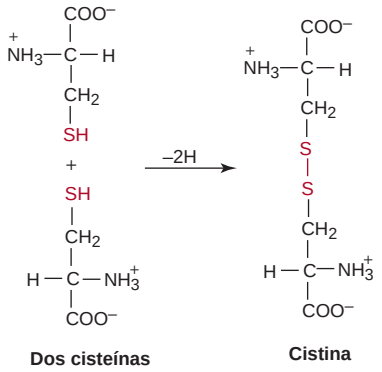


FIGURA 3.12
Formación del enlace de la cistina.

tantes funciones fisiológicas y bioquímicas en los seres humanos (Tabla 3.2). Las estructuras primarias se escriben según una convención estándar y se numeran a partir de su extremo NH_2 terminal en dirección al extremo COOH terminal, de acuerdo con el orden de adición de los aminoácidos a la cadena durante la biosíntesis. Así, en el caso de la hormona liberadora de la tirotropina (Tabla 3.2), el residuo de ácido glutámico de la izquierda es el aminoácido NH_2 terminal del tripéptido, o el residuo 1 de la secuencia. La prolina es el aminoácido COOH terminal, y es el residuo 3. La dirección definida de la cadena polipeptídica es de Glu a Pro (desde el aminoácido NH_2 terminal hacia el aminoácido COOH terminal).

La cistina es un aminoácido derivado

Un aminoácido derivado presente en muchas proteínas es la **cistina**. La cistina se forma por oxidación de los tioles de dos cadenas laterales de cisteína, que se unen formando un enlace disulfuro covalente (Figura 3.12). En las proteínas las uniones disulfuro de la cistina, formadas a partir de cisteínas separadas una de otra en una cadena polipeptídica (intracatenarias) o entre dos cadenas polipeptídicas (intercatenarias), tienen un importante papel en la estabilización de la conformación plegada de las proteínas.

3.3 CARGA Y PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS Y LAS PROTEÍNAS

Los grupos ionizables de los aminoácidos y las proteínas son fundamentales para su función biológica

Los grupos ionizables comunes a las proteínas y a los aminoácidos se muestran en la Tabla 3.3. Las formas ácidas se encuentran a la izquierda del signo de equilibrio y las formas básicas están a la derecha. Al formar su base conjugada, la forma ácida libera un protón. A la inversa, la forma básica capta un protón para formar el ácido respectivo. La disociación de un protón de un ácido se caracteriza por una **constante de disociación** ácida (K'_a) y su valor de pK'_a: p$K'_a = \log_{10}(1/K'_a)$. La Tabla 3.3 muestra un intervalo de valores de pK'_a para cada grupo ácido, pues el pK'_a real depende del medio en que se encuentre el grupo ácido. Por ejemplo, cuando un grupo amonio cargado positivamente ($—NH_3^+$) está situado cerca de un grupo cargado negativamente dentro de una proteína, la carga negativa estabiliza el grupo amino cargado positivamente, dificultando así la disociación de su protón. El pK'_a del $—NH_3^+$ tendrá un valor superior al normal para un grupo amonio en ausencia de estabilización por una carga negativa cercana. Otros factores distintos de la carga que pueden afectar el pK'_a de un grupo ácido son la polaridad del medio, la ausencia o presencia de agua y la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno. Además, los grupos ácidos (α-COOH y α-NH_3^+) situados en los extremos de la cadena polipeptídica tienen normalmente valores de pK'_a más bajos que los mismos tipos de grupos ácidos de las cadenas laterales (Tabla 3.4). Los aminoácidos cuyos grupos R contienen átomos de nitrógeno (Lys y Arg) son los **aminoácidos básicos**, ya que estas cadenas laterales tienen valores de pK'_a relativamente elevados y actúan como bases a pH fisiológico. Normalmente se encuentran en sus formas ácidas, cargadas positivamente, a pH fisiológico. Los aminoácidos con cadenas laterales que contienen un grupo ácido carboxílico tienen valores de pK'_a relativamente bajos y se denominan **aminoácidos ácidos**. Se encuentran normalmente en forma desprotonada y están cargados negativamente a

TABLA 3.3 Valores de pK'_a característicos de los grupos ácidos comunes encontrados en las proteínas.

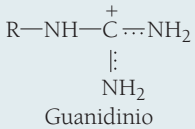
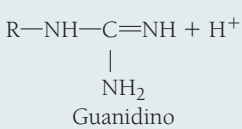
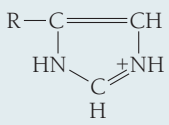
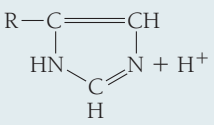
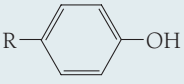
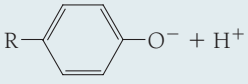
Lugar donde se encuentra el grupo ácido	*Forma ácida*		*Forma básica*	*Intervalo aproximado de pK_a para el grupo*
Residuo NH_2-terminal en los péptidos, lisina	$R—NH_3^+$ Amonio	⇌	$R—NH_2 + H^+$ Amina	7,6–10,6
Residuo COOH-terminal en los polipéptidos, glutamato, aspartato	R—COOH Ácido carboxílico	⇌	$R—COO^- + H^+$ Carboxilato	3,0–5,5
Arginina	 Guanidinio	⇌	 Guanidino	11,5–12,5
Cisteína	R—SH Tiol	⇌	$R—S^- + H^+$ Tiolato	8,0–9,0
Histidina	 Imidazolio	⇌	 Imidazol	6,0–7,0
Tirosina	 Fenol	⇌	 Fenolato	9,5–10,5

TABLA 3.4 **pK'_a de las cadenas laterales y los grupos ácido terminales de la ribonucleasa.**

	$-NH_3^+$	$-COOH$
Cadena lateral	Lisinas ≃ 10,2	Glu y Asp ≃ 4,6
Cadena terminal	N-terminal = 7,8	C-terminal = 3,8

pH fisiológico. Las proteínas en las que la proporción (ΣLys + ΣArg)/(ΣGlu + ΣAsp) es mayor que 1 se denominan **proteínas básicas**. Las proteínas en las que la anterior proporción es menor que 1 se denominan **proteínas ácidas**.

Puede calcularse la forma iónica de un aminoácido o una proteína a un pH determinado

A partir del pK'_a de cada uno de los grupos ácidos de un aminoácido o una proteína y la **ecuación de Henderson–Hasselbalch** (Figura 3.13) puede calcularse la forma iónica de la molécula a un pH determinado. Se trata de una importante relación, ya que muestra el cambio con el pH del estado de ionización y de carga de una molécula. Las actividades fisiológicas de una molécula cambian según el pH y el estado de ionización. Por ejemplo, un enzima puede requerir para su actividad catalítica que el imidazol de una histidina se encuentre en su forma básica. Si el pK'_a de la histidina es 6,0, a pH 6,0 la mitad de las moléculas de enzima estarán en la forma básica (imidazol) activa y la otra mitad en la forma ácida (imidazolio) inactiva. De modo que el enzima mostrará un 50% de su actividad potencial. A pH 7,0, el pH es una unidad superior al pK'_a del imidazolio, y el cociente [imidazol]/[imidazolio] es 10:1 (Tabla 3.5). Según esta relación, el enzima mostrará [10/(10 + 1)] × 100% = 91% de su actividad potencial máxima. Por lo tanto, un cambio en el pH tiene un efecto espectacular sobre la actividad del enzima. La mayor parte de las actividades de las proteínas presentan una dependencia similar del pH, debido a sus grupos ácidos y básicos.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]}$$

o

$$pH - pK_a = \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]}$$

FIGURA 3.13
Ecuación de Henderson–Hasselbalch.
(En la p. 11 se encuentra una exposición más detallada de esta ecuación.)

Titulación de un ácido monoamino monocarboxílico: Determinación del pH isoeléctrico

El examen de la titulación de los grupos ionizables de un aminoácido sencillo facilita la comprensión de la relación entre las formas ácida y básica de una proteína y la carga. Como se presenta en la Figura 3.14, la leucina contiene un α-COOH con pK'_a = 2,4 y un α-NH_3^+ con pK'_a = 9,6. A pH 1,0 la forma iónica predominante (forma I) de la leucina tiene una carga de +1 y se desplaza hacia el cátodo en un campo eléctrico. La adición de 0,5 equivalentes de base neutralizará la mitad de los grupos α-COOH de la leucina; es decir, el cociente $[COO^-]/[COOH]$ será igual a 1. La ecuación de Henderson–Hasselbalch, con el segundo término del segundo miembro de la ecuación, $\log_{10}[(\text{base})/(\text{ácido})] = \log_{10}[1] = 0$, para una relación

TABLA 3.5 **Relación entre la diferencia de pH y pK'_a ácido y el cociente de las concentraciones de base y su ácido conjugado.**

pH − pK'_a (Diferencia entre pH y pK'_a)	*Cociente entre la concentración de base y su ácido conjugado*
0	1
1	10
2	100
3	1000
−1	0,1
−2	0,01
−3	0,001

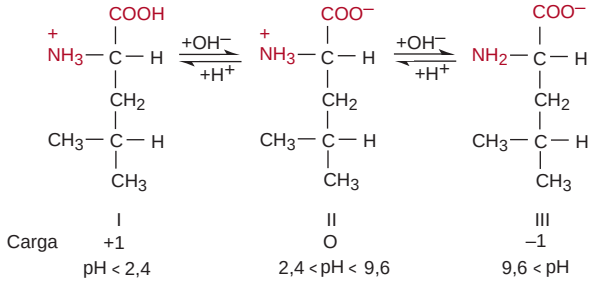


FIGURA 3.14
Formas iónicas de la leucina.

de base conjugada a ácido de 1:1, muestra que cuando el α-COOH está titulado en un 50% el pH es igual al $pK_{a(\alpha COOH)}$ (Figura 3.15).

La adición de 1 equivalente de base neutralizará completamente el α-COOH, pero deja intacto el grupo α-NH_3^+. En la forma resultante (II), el α-COO^- cargado negativamente y el α-NH_3^+ cargado positivamente se compensan mutuamente, y la carga neta es cero. La forma II es un **zwitterión**; es decir, una forma iónica en la cual el total de cargas positivas es exactamente igual al total de cargas negativas. Dado que su carga neta es cero, una molécula zwitteriónica no se desplaza ni hacia el cátodo ni hacia el ánodo en un campo eléctrico. La adición de otros 0,5 equivalentes de base a la forma zwitteriónica de la leucina (el total de base añadida es de 1,5 equivalentes) conduce a la neutralización de la mitad de los grupos α-NH_3^+. En este punto de la titulación, la relación $[NH_2]/[NH_3^+] = 1$ y el pH es igual al pK'_a del grupo α-NH_3^+ (Figura 3.15). La adición de otros 0,5 equivalentes de base (en total dos equivalentes completos; Figura 3.15) completa la neutralización del grupo α-NH_3^+ a su forma básica (α-NH_2). El pH sube hasta más de 11, y la especie molecular predominante tiene una carga negativa de -1 (forma III).

Resulta útil calcular el pH al cual un aminoácido es eléctricamente neutro y está en forma zwitteriónica. Este pH se conoce como **pH isoeléctrico**, y su símbolo es **p*I***. El valor del p*I* es una constante para un compuesto determinado en unas condiciones definidas de fuerza iónica y temperatura. Para moléculas monoamino monocarboxílicas como la leucina, el p*I* es el promedio de los dos valores de pK'_a que determinan los límites del zwitterión. Para la leucina el p*I* se calcula de la forma siguiente:

$$pI = \frac{pK'_a\text{COOH} + pK'_a\text{NH}_3^+}{2} = \frac{2{,}4 + 9{,}6}{2} = 6{,}0$$

A pH $>$ 6,0 la leucina adquiriere una carga negativa parcial que aumenta con el pH hasta una carga negativa completa de -1 (forma III) (Figura 3.14). A pH $<$ 6 la leucina tiene una carga positiva parcial, hasta que a pH muy bajo adquiere una carga de $+1$ (forma I) (Figura 3.14). La carga parcial a cualquier pH se puede calcular a partir de la ecuación de Henderson–Hasselbalch o por extrapolación de la curva de titulación de la Figura 3.15.

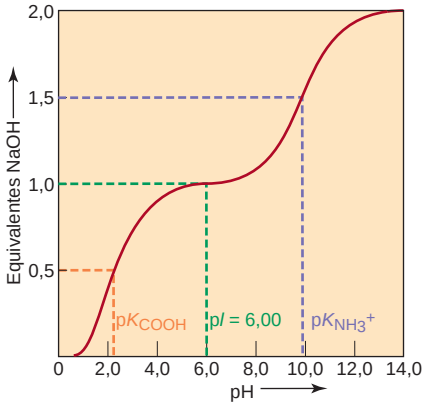


FIGURA 3.15
Curva de titulación de la leucina.

Titulación de un ácido monoamino dicarboxílico

Un ejemplo más complicado de la relación entre carga molecular y pH es el del ácido glutámico. Como se muestra en las Figuras 3.16 y 3.17, en el ácido glutá-

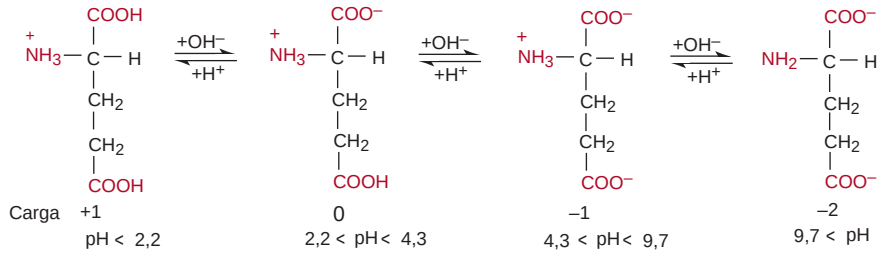


FIGURA 3.16
Formas iónicas del ácido glutámico.

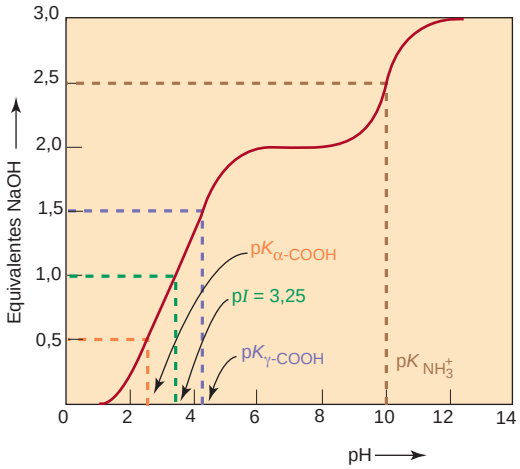


FIGURA 3.17
Curva de titulación del ácido glutámico.

mico, el α-COOH tiene un $pK'_a = 2{,}2$; el γ-COOH un $pK'_a = 4{,}3$ y el α-NH_3^+ un $pK'_a = 9{,}7$. La forma zwitteriónica se genera después de que se haya añadido 1,0 equivalente de base a la forma presente a pH bajo, y el pH isoeléctrico (p*I*) se calcula a partir del promedio de los dos valores de pK'_a que determinan los límites de la forma zwitteriónica:

$$pI = \frac{2{,}2 + 4{,}3}{2} = 3{,}25$$

Así pues, a valores de pH superiores a 3,25 la molécula tiene carga negativa neta, hasta que a pH elevado adquiere una carga neta de -2. A pH $< 3{,}25$ el ácido glutámico está cargado positivamente, y a un pH extremadamente bajo tiene una carga positiva neta de $+1$.

TABLA 3.6 Valores de p*I* de algunas proteínas representativas.

Proteína	*p*I
Pepsina	~1
Albúmina sérica humana	5,9
α_1-Lipoproteína	5,5
Fibrinógeno	5,8
Hemoglobina A	7,1
Ribonucleasa	7,8
Citocromo *c*	10,0
Histona de timo	10,6

Relación general entre el pH y la carga de los aminoácidos y proteínas

El análisis de las formas cargadas de otros aminoácidos comunes muestra que la relación entre pH y carga para la leucina y el glutamato tiene validez general. A un pH inferior al p*I* el aminoácido está cargado positivamente; y a un pH superior al p*I* el aminoácido está cargado negativamente. El grado de carga positiva o negativa es función de la magnitud de la diferencia entre el pH y el p*I*. Dado que las proteínas son polielectrolitos complejos que contienen múltiples grupos ácidos ionizables que determinan los límites de sus formas zwitteriónicas, resulta difícil calcular el pH isoeléctrico de una proteína a partir de sus valores de pK'_a ácidos utilizando la ecuación de Henderson–Hasselbalch. Por este motivo, los valores de p*I* de las proteínas se miden siempre experimentalmente, determinando el valor del pH en el que la proteína no se mueve en un campo eléctrico. Los valores de p*I* obtenidos para algunas proteínas representativas se dan en la Tabla 3.6.

Al igual que con los aminoácidos, a un pH superior al p*I* la proteína tendrá una carga neta negativa. A un pH inferior al p*I*, la proteína tendrá una carga neta positiva (Figura 3.18). La magnitud de la carga neta de una proteína aumenta con la diferencia entre el pH y el p*I*. Por ejemplo, la albúmina plasmática humana contiene 585 residuos aminoácidos, de los cuales 61 son glutamato, 36 aspartato, 57 lisina, 24 ar-

Cuando pH > p*I*, la proteína tiene carga negativa
Cuando pH < p*I*, la proteína tiene carga positiva

FIGURA 3.18
Relación entre el pH de la disolución, el p*I* de la proteína y la carga de la proteína.

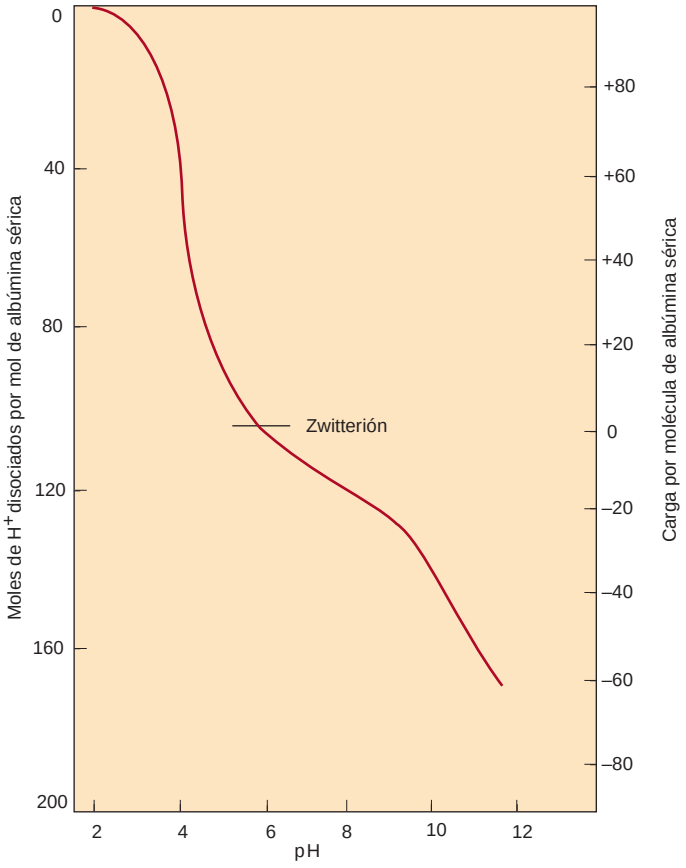
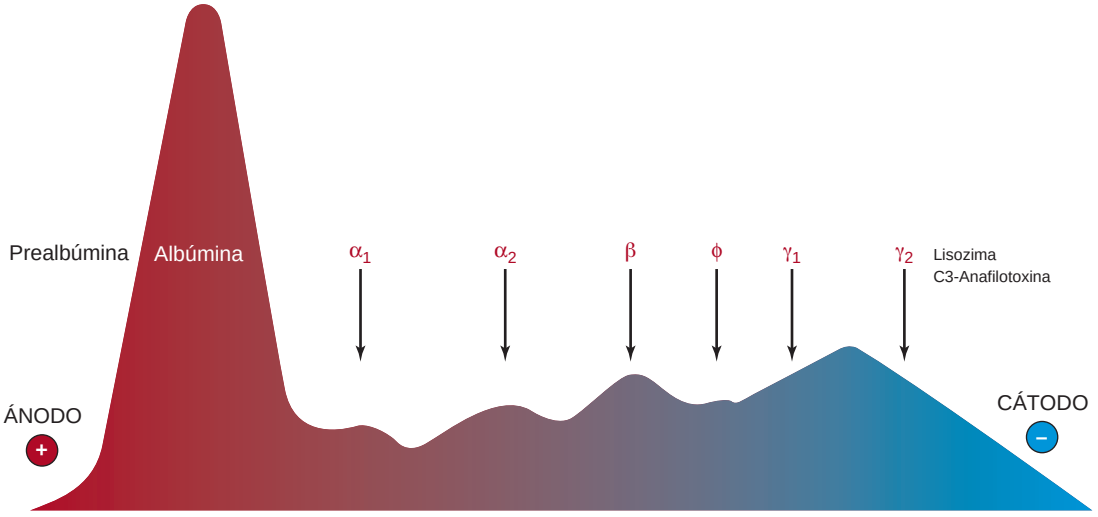


FIGURA 3.19
Curva de titulación de la albúmina sérica humana a 25°C y 0,150 de fuerza iónica.
Reproducido de Tanford, C. J. Am. Chem. Soc. *72:441, 1950.*

ginina y 16 histidina. En la Figura 3.19 se muestra la curva de titulación de esta molécula compleja. La albúmina tiene un p*I* = 5,9, pH al cual su carga neta es cero. A pH 7,5 los grupos imidazolio de la histidina están parcialmente neutralizados y la albúmina tiene una carga negativa de −10. A pH 8,6 la carga neta es de aproximadamente −20. A pH 11 la carga neta es de aproximadamente de −60. A valores más bajos que el p*I*, a pH 3, la carga neta aproximada de la albúmina es de +60.

Los aminoácidos y proteínas pueden separarse según sus valores de p*I*

Las técnicas de electroforesis, enfoque isoeléctrico y cromatografía de intercambio iónico separan y caracterizan las moléculas biológicas según sus p*I* (véase la p. 140). En medicina clínica, la separación de las proteínas plasmáticas mediante electroforesis ha dado lugar a una clasificación de las proteínas basada en su movilidad electroforética relativa. La separación se lleva a cabo normalmente a pH 8,6, que es superior a los valores de p*I* de las principales **proteínas plasmáticas**. En consecuencia, las proteínas están cargadas negativamente y se desplazan hacia el ánodo a una velocidad que depende de su carga neta. Los principales componentes observados según su orden de migración son la albúmina, las α_1-, α_2- y β-globulinas, el fibrinógeno y las γ_1- y γ_2-globulinas (Figura 3.20). Algunas de estas fracciones contienen decenas o centenares de proteínas diferentes con una velocidad de desplazamiento similar a pH 8,6. No obstante, en cada pico predominan determinadas proteínas y la variación de sus cantidades relativas es característica de ciertas enfermedades (Figuras 3.20 y 3.21; véase Apli. Clín. 3.1).



α_1

α_1-Glicoproteína ácida
α_1-T-Glicoproteína
α_1-Antitripsina
Transcortina
α_1-Antiquimotripsina
α_1-B-Glicoproteína
9,5 S-α_1-Glicoproteína
Proteína fijadora de vitamina D
α_1-Lipoproteínas

α_1/α_2

Globulina fijadora de tiroxina
Zn-α_2-glicoproteína
Gc globulina
Ceruloplasmina
Inhibidor inter-α-tripsina
Antitrombina III
Factor X (Stuart-Prower)
Transcobalamina I
C9

α_2

Proteína fijadora de retinol
α_2 HS-Glicoproteína
Glicoproteína 3,8 S-α_2 rica en histidina
Haptoglobina
Proteína zonal de embarazo
α_2-Macroglobulina
Protrombina
Factor antihemofílico
Inactivador C1
C1s

α_2/β_1

Colinesterasa sérica
8 S-α_3-glicoproteína
4 S-α_2,, β_1-glicoproteína
Transcobalamina III

β_1

Hemopexina
β-Globulina fijadora de esteroides
Transferrina
β_1-Glicoproteína específica del embarazo
Globulina insoluble en frío
Factor V (Acelerina)
Factor VII (Proconvertina)
Factor IX (Christmas)
Plasminógeno
Proactivador C3
Transcobalamina II
β-Lipoproteínas
C1r, C2
C4, C5

β_2

β_2-Macroglobulina
β_2-Glicoproteína III
β_2-Glicoproteína I
Fibrinógeno
Factor XI (PTA)
Factor XII (Hageman)
Factor XIII (FSF)
C3, C6, C7
Activador C3 (β_2II)

γ_1

IgG
IgA
IgD
IgE
IgM
Amilasa

γ_2

IgG
Clq
Properdina

FIGURA 3.20
Patrón electroforético de las proteínas plasmáticas a pH 8,6.
El patrón muestra el orden de migración a lo largo del eje horizontal con las proteínas de mayor movilidad más próximas al ánodo. La altura de las bandas a lo largo del eje vertical indica la concentración de proteína. Las proteínas mayoritarias están señaladas debajo de los picos de movilidad electroforética.

Reproducido con permiso de Heide, K., Haupt, H., and Schwick, H. G. In: F. W. Putnam (Ed.), The Plasma Proteins, *2nd ed., Vol. III. New York: Academic Press, 1977, p. 545.*

Las cadenas laterales de los aminoácidos tienen propiedades polares o apolares

La **hidrofobicidad** de las cadenas laterales de los aminoácidos es fundamental para el plegamiento de una proteína en su estructura nativa y para la estabilidad de la proteína plegada. La Figura 3.22 muestra los valores de hidrofobicidad relativa de los aminoácidos comunes basados en su solubilidad diferencial en una mezcla de agua y un disolvente no polar. La escala está basada en la glicina, cuyo valor se considera cero. Las cadenas laterales de los aminoácidos que se disuelven preferentemente en el disolvente no polar tienen un valor de hidrofobicidad positivo (+), tanto más positivo cuanto mayor sea su preferencia por el disolvente no polar. Los

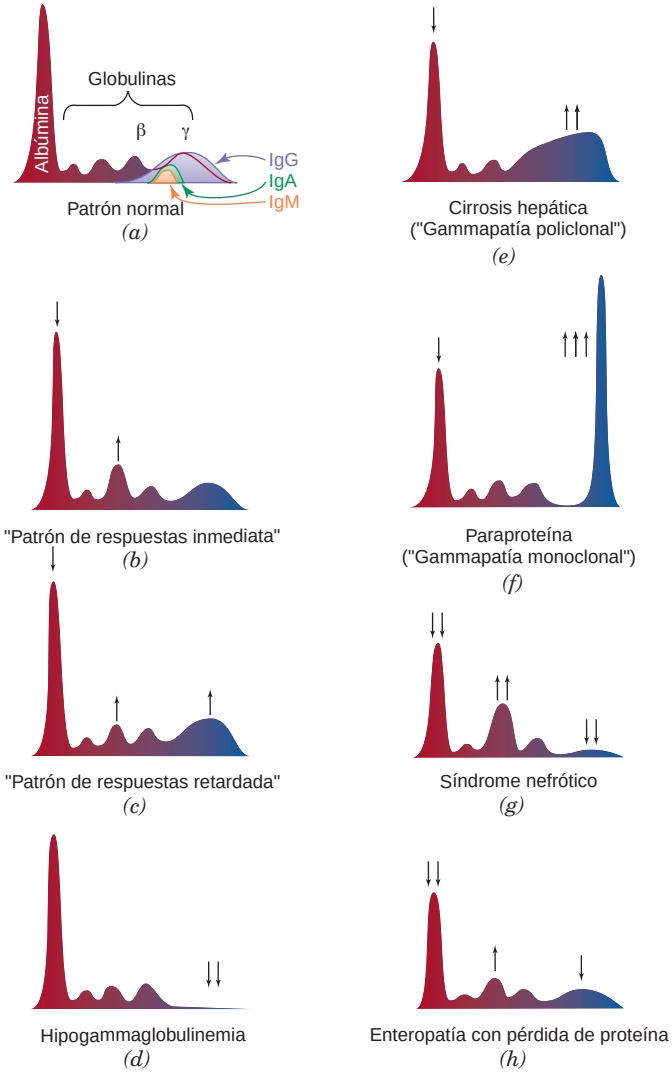
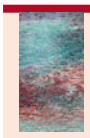


FIGURA 3.21
Ejemplos de patrones de movilidad electroforética observados en individuos normales y en pacientes con concentraciones anormales de proteínas séricas, analizados por electroforesis en gel de agarosa. *Reproducido de McPherson, R. A. En: J. B. Henry (Ed.),* Clinical Diagnosis and Management, *17th ed. Philadelphia: Saunders, 1984.*



APLICACIÓN CLÍNICA 3.1
Las proteínas plasmáticas en el diagnóstico médico

El análisis electroforético de las proteínas plasmáticas se utiliza habitualmente en el diagnóstico médico. La electroforesis de plasma tamponado a pH 8,6 separa, a medida que se desplazan hacia el ánodo en el campo eléctrico, las principales proteínas plasmáticas en bandas o picos en función de las diferencias de carga (véase el texto). En la Figura 3.21 se muestran ejemplos de patrones electroforéticos anómalos. La "respuesta inmediata" que se produce a consecuencia de estrés o inflamación causados por infección, lesión o trauma quirúrgico, y en la cual las haptoglobinas de la banda α_2 están selectivamente incrementadas se muestra en el patrón (*b*). El patrón (*c*) corresponde a la "respuesta tardía" relacionada con infección y muestra un aumento del pico de la γ-globulina debido al incremento de las inmunoglobulinas. El patrón (*d*) es un ejemplo de hipogammaglobulinemia debida a una enfermedad inmunosupresora. Como puede observase en el patrón (*e*), en la cirrosis hepática se produce una fuerte elevación de las γ-globulinas con disminución de la albúmina. Las gammapatías monoclonales se deben a la síntesis clonal de una sola inmunoglobulina, y dan lugar a una banda muy marcada de γ-globulinas, como en el patrón (*f*). El síndrome nefrótico presenta una pérdida selectiva de las proteínas plasmáticas de menor masa molecular, como en el patrón (*g*). El patrón muestra una disminución de la albúmina (65 kDa), pero las bandas compuestas por proteínas de mayor masa molecular, α_2-macroglobulina (725 kDa) y β-lipoproteínas (2000 kDa) de la banda α_2, se mantienen. El patrón (h) corresponde a un paciente con enteropatía con pérdida proteica. El ligero incremento de la banda α_2 en el patrón (*h*) se debe a una respuesta inmediata o tardía frente a un estímulo estresante, como se ha indicado anteriormente para los patrones (*b*) y (*c*).

Ritzmann, S. E. and Daniels, J. C. Serum protein electrophoresis and total serum proteins. En: S. E. Ritzmann y J. C. Daniels (Eds.), *Serum Protein Abnormalities, Diagnostic and Clinical Aspects.* Boston: Little, Brown and Co., 1975, pp. 3–25; y McPherson, R. A. Specific proteins. En: J. B. Henry (Ed.), *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods,* 17th ed. Philadelphia: Saunders, 1984, p. 204.

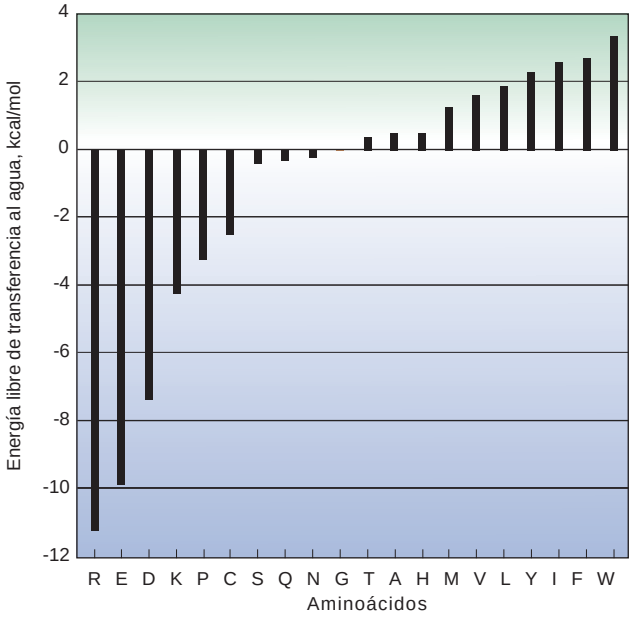


FIGURA 3.22
Hidrofobicidad relativa de las cadenas laterales de los aminoácidos.
Basada en el reparto relativo del aminoácido entre un disolvente orgánico y el agua. Los valores negativos indican preferencia por el agua y los positivos preferencia por los disolventes no polares (etanol o dioxano) en relación con la glicina (véase el texto).
Basado en datos tomados de Von Heijne, G. and Blomberg, C. Eur. J. Biochem. *97:175, 1979; y de Nozaki, Y. y Tanford, C.* J. Biol. Chem. *246:2211, 1971.*

aminoácidos más hidrofóbicos se encuentran ocultos en el interior de las estructuras proteicas plegadas, lejos del agua que interacciona con la superficie de las proteínas solubles. Sin embargo, esta correlación no es perfecta debido a la naturaleza anfótera de muchos de los aminoácidos hidrofóbicos, que sitúan las partes más polares de sus cadenas laterales cerca de la superficie para interaccionar con el agua del exterior. Además, al contrario de lo que sería de esperar, no todas las cadenas laterales hidrofóbicas están ocultas en la estructura tridimensional plegada de una proteína globular. Cuando están en la superficie, los grupos hidrofóbicos se encuentran generalmente dispersos entre cadenas laterales polares. Cuando se presenta un agrupamiento de cadenas laterales apolares en la superficie, éste está normalmente asociado con una función, tal como proporcionar un centro de fijación de moléculas de sustrato mediante interacciones hidrofóbicas.

Las cadenas laterales cargadas se hallan en su mayor parte en la superficie de las proteínas globulares solubles, donde están estabilizadas por interacciones energéticas favorables con el agua. La ubicación poco frecuente de una cadena lateral cargada en el interior de una proteína globular implica normalmente un papel funcional importante de la carga "enterrada" dentro del interior apolar en la estabilización de la conformación de la proteína o la participación en el mecanismo catalítico.

Los aminoácidos experimentan un gran número de reacciones químicas

Los aminoácidos de las proteínas reaccionan con una serie de reactivos químicos que pueden ser utilizados para investigar la función de cadenas laterales específicas. Algunas reacciones químicas comunes se presentan en la Tabla 3.7. Se han sintetizado reactivos que modifican las cadenas laterales ácidas para que se unan a sitios específicos de una estructura proteica plegada, como es el sitio de unión de sustrato. La estrategia consiste en modelar las características estructurales del sustrato natural del enzima en el reactivo modificador. El reactivo se une al sitio activo del enzima como un sustrato natural y reacciona con una cadena lateral específica, que, de esta forma, puede ser localizada en el sitio de unión de sustrato, lo cual ayuda a identificar su papel en el mecanismo catalítico del enzima.

TABLA 3.7 Algunas reacciones químicas de los aminoácidos

Grupo reactivo	*Reactivo o reacción*	*Producto*
Grupos amino (—NH_2)	Ninhidrina	Producto de coloración azul que absorbe a 540 nm[a]
	Fluorescamina	Producto fluorescente
Grupos ácido carboxílico	Alcoholes	Ésteres
	Aminas	Amidas
	Carbodiimida	Activa para la reacción con nucleófilos
—NH_2 de Lys	2,3,6-Trinitrobenceno sulfonato	Producto que absorbe a 367 nm
	Anhídridos	Aminas acetiladas
	Aldehídos	Forma aductos de base de Schiff
Grupo guanidino de Arg	Reacción de Sakaguchi	Producto de color rosa-rojo que se utiliza para valorar Arg
Fenol de Tyr	I_2	Yodación de grupos hidroxilo en posición orto en anillos aromáticos
	Anhídrido acético	Acetilación de —OH
Átomo S de la cadena lateral de Met	CH_3I	Producto de metil sulfonio
	$[O^-]$ o H_2O_2	Metionina sulfóxido o metionina sulfona
—SH de Cys	Yodoacetato	Carboximetil tiol éter
	N-Etilmaleimida	Producto de adición con S
	Mercuriales orgánicos	Aductos mercuriales
	Ácido perfórmico	Ácido cisteico (—SO_3H)
	Ácido ditionitrobenzoico	Producto de color amarillo que se utiliza para cuantificar grupos—SH
Imidazol de His y fenol de Tyr	Reactivo de Pauly	Producto de color amarillo a rojizo

[a] El grupo imino de la prolina reacciona con la ninhidrina formando un producto que absorbe luz a 440 nm (color amarillo).

3.4 ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS PROTEÍNAS

Es necesario disponer de la **estructura primaria** (secuencia de aminoácidos) de una proteína para comprender su estructura, su mecanismo de acción y su relación con otras proteínas con función fisiológica similar. La estructura primaria de la **insulina** ilustra la importancia que tiene el conocimiento de la estructura primaria para comprender la biosíntesis de la proteína y sus formas fisiológicas. La insulina se sintetiza en las células de los islotes pancreáticos como un precursor inactivo de cadena única, la **proinsulina**, cuya estructura primaria se muestra en la Figura 3.23. La cadena polipeptídica contiene 86 aminoácidos y 3 puentes disulfuro de cistina intracatenarios. Se convierte en insulina biológicamente activa mediante cortes proteolíticos de su estructura primaria, antes de su secreción por las células de los islotes. Proteasas presentes en las células de los islotes cortan los enlaces peptídicos entre los restos 30 y 31 y 65 y 66 de la proinsulina, liberando un segmento de 35 aminoácidos (el **péptido C**) y la insulina, que consiste en dos cadenas polipeptídicas (A y B) de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente, unidas covalentemente por los mismos puentes disulfuro presentes en la proinsulina (Figura 3.23). El péptido C experimenta una modificación posterior en los islotes pancreáticos por proteasas que hidrolizan un dipéptido del extremo COOH-terminal y un dipéptido del extremo NH_2-terminal. El péptido C modificado se segrega a la sangre junto con la insulina.

Además de proporcionar información sobre la ruta de formación de la insulina activa, la comparación de las estructuras primarias de insulinas procedentes de dis-

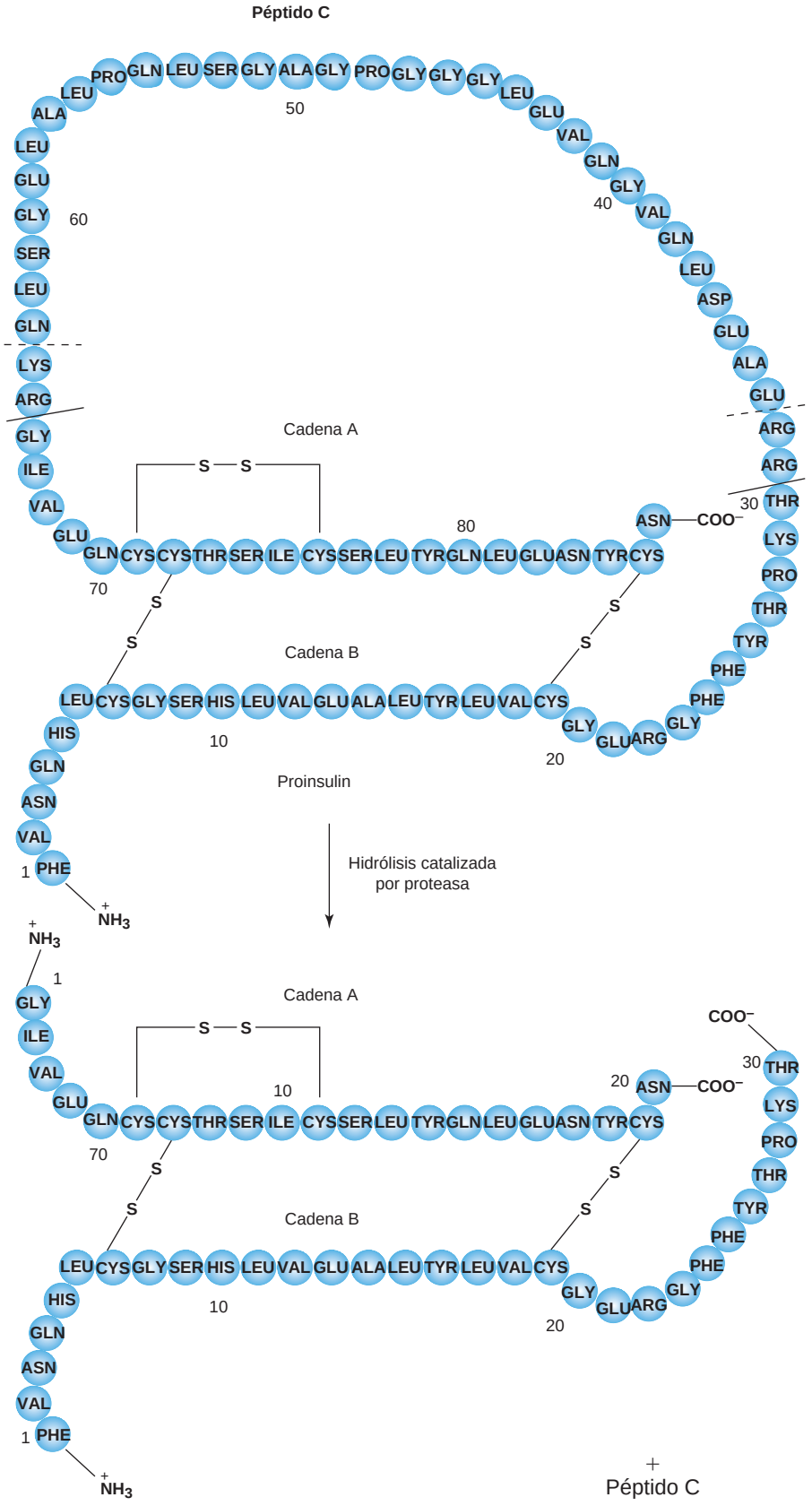


FIGURA 3.23
Estructura primaria de la proinsulina, la insulina y el péptido C humanos.
En la proinsulina, el péptido de la cadena B se extiende desde la Phe en la posición 1 a la Thr en la posición 30, el péptido C desde la Arg en la posición 31 a la Arg en la posición 65 y el péptido A desde la Gly en la posición 66 a la Asn en la posición 86. Se encuentran enlaces de cistina en las posiciones 7–72, 19–85 y 71–76 de la proinsulina.
Reproducido de Bell, G. I., Swain, W. F., Pictet, R., Cordell, B., Goodman, H. M. y Rutter, W. J., Nature *282:525, 1979.*

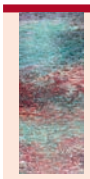
TABLA 3.8 Variaciones en las posiciones A8, A9, A10 y B30 de la insulina.

Especie	*A8*	*A9*	*A10*	*B30*
Hombre	Thr	Ser	Ile	Thr
Vaca	Ala	Ser	Val	Ala
Cerdo	Thr	Ser	Ile	Ala
Oveja	Ala	Gly	Val	Ala
Caballo	Thr	Gly	Ile	Ala
Perro	Thr	Ser	Ile	Ala
Pollo[a]	His	Asn	Thr	Ala
Pato[a]	Glu	Asn	Pro	Thr

[a] Tanto en el pollo como en el pato las posiciones 1 y 2 de la cadena B son Ala, mientras que en otras especies de la tabla la posición 1 es Phe y la posición 2 es Val en la cadena B.

tintas especies de animales, pone en evidencia el papel de determinados aminoácidos. Las estructuras primarias alineadas muestran identidad de residuos en la mayoría de las posiciones de los aminoácidos, con excepción de los residuos 8, 9 y 10 de la cadena A y del residuo 30 de la cadena B. Los aminoácidos situados en estas posiciones son muy variables en las diferentes insulinas animales (Tabla 3.8) sin que aparentemente se vean afectadas las propiedades biológicas (véase la Apli. Clín. 3.2). Otros aminoácidos rara vez son sustituidos, lo que sugiere que tienen un papel esencial en la función de la insulina.

La comparación de secuencias se utiliza comúnmente para predecir la similitud de estructura y función entre proteínas. Tales comparaciones requieren en general un alineamiento de las secuencias que maximice el número de residuos idénticos y que minimice el número de inserciones o deleciones requeridas para conseguir el alineamiento. Dos secuencias se denominan **homólogas** cuando pueden alinearse en una elevada proporción. En sentido estricto, la homología se refiere solamente a proteínas que han evolucionado a partir del mismo gen. El término **analogía** se utiliza para la descripción de secuencias de proteínas que son similares estructuralmente, pero para las cuales no se ha demostrado ninguna relación evolutiva. La sustitución de un aminoácido por otro de polaridad similar (p. ej., Val en lugar de Ile en la posición 10 de la insulina) se denomina sustitución **conservadora**, y se observa comúnmente en las secuencias de aminoácidos de una misma proteína de diferentes especies animales. Los aminoácido que se encuentran siempre en la misma posición se denominan **residuos invariables**, y puede suponerse que tienen un papel esencial en la estructura o en la función de la proteína. Por el contrario, una sustitución **no conservadora** implica el cambio de un aminoácido por otro de diferente polaridad. Ello puede dar lugar a importantes cambios en las propiedades

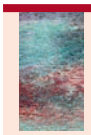


APLICACIÓN CLÍNICA 3.2

Diferencias en la estructura primaria de las insulinas utilizadas en el tratamiento de la diabetes mellitus

Para el tratamiento de diabéticos humanos se utilizan habitualmente insulinas de cerdo (porcina) y vaca (bovina). Debido a las diferencias en la secuencia de aminoácidos con la insulina humana, algunos diabéticos presentan una respuesta alérgica inicial a la insulina inyectada, ya que su sistema inmunológico la reconoce como extraña o desarrollan resistencia a la insulina, debido a la presencia de un elevado nivel de anticuerpos antiinsulina en una etapa avanzada del tratamiento. No obstante, el número de diabéticos que presentan una respuesta inmunológica perjudicial a las insulinas porcina y bovina es pequeño; la mayoría de los diabéticos humanos pueden utilizar insulinas no humanas sin complicaciones inmunológicas. La tolerancia de las insulinas de cerdo y vaca se debe al pequeño número de cambios y a la naturaleza conservadora de éstos en las secuencias de aminoácidos de las insulinas. Estos cambios en la estructura primaria no alteran de manera significativa la estructura tridimensional de las insulinas en relación con la humana. La insulina de cerdo es normalmente, para los individuos insulino-reactivos, más tolerable que la insulina de vaca ya que es más parecida en secuencia a la insulina humana (véase la Tabla 3.8). Actualmente se dispone de insulina humana para uso clínico, que puede obtenerse utilizando bacterias manipuladas genéticamente o por modificación de la insulina de cerdo.

Brogdon, R. N. and Heel, R. C. Human insulin: a review of its biological activity, pharmacokinetics, and therapeutic use. *Drugs* 34:350, 1987.



APLICACIÓN CLÍNICA 3.3

En la anemia falciforme se produce una mutación no conservadora

La hemoglobina S (HbS) es una variante de la hemoglobina adulta normal (HbA_1) en la que se encuentra una sustitución no conservadora en la sexta posición de la cadena β de la globina de la HbA_1. Mientras que en la HbA_1 esta posición está ocupada por un residuo de ácido glutámico, en la HbS esta posición está ocupada por una valina. En consecuencia, en la HbS se ha reemplazado un grupo de cadena lateral polar en la superficie exterior de la molécula por una cadena lateral con un grupo no polar hidrofóbico (una mutación no conservadora). Las interacciones hidrofóbicas de esta valina no polar hacen que la HbS en su conformación desoxi polimerice con otras moléculas de desoxi-HbS, causando la precipitación de la hemoglobina dentro de los eritrocitos. La precipitación de la hemoglobina confiere a los eritrocitos su aspecto falciforme, que da lugar a una elevada tasa de hemólisis y una falta de elasticidad durante la circulación a través de los capilares más estrechos, que quedan obstruidos por los eritrocitos anormales.

Sólo los individuos homocigóticos para la HbS padecen la enfermedad. Los individuos heterocigóticos para la HbS contienen, aproximadamente, un 50% de HbA_1 y un 50% de HbS en sus eritrocitos y no muestran síntomas de anemia falciforme excepto en condiciones de extrema hipoxia.

Los individuos heterocigóticos para la HbS tienen resistencia al parásito de la malaria, que pasa parte de su ciclo vital en los eritrocitos. Este es un factor selectivo para el gen de la HbS en regiones con malaria, y es el motivo de la elevada frecuencia de este gen letal en el acervo genético humano. Aproximadamente el 10% de los estadounidenses de raza negra son heterocigóticos para la HbS, mientras que el 0,4% son homocigóticos y padecen anemia falciforme. La HbS se detecta por electroforesis en gel. Debido a que carece de un glutamato, es menos ácida que la HbA. La hemoglobina HbS, por consiguiente, no migra tan rápidamente hacia el ánodo como lo hace la HbA. El diagnóstico de la anemia falciforme también es posible mediante técnicas de DNA recombinante.

Bunn, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl. J. Med.* 337:762, 1997: and Embury, S. H. The clinical pathophysiology of sickle-cell disease. *Annu. Rev. Med.* 37:361, 1986.

de la proteína resultante, a no ser que ocurra en regiones aparentemente poco importantes desde el punto de vista funcional (véase la Apli. Clín. 3.3). La polaridad es solamente una de las propiedades físicas de los aminoácidos que determina si una sustitución alterará significativamente la función de la proteína. Otras propiedades físicas importantes son el volumen y el área superficial del residuo.

3.5 NIVELES SUPERIORES DE ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La estructura primaria de una proteína se refiere a su estructura covalente. En ella se incluye la secuencia de aminoácidos y la localización de los puentes disulfuro (cistina). Los niveles superiores de organización proteica se refieren a propiedades conformacionales de la estructura primaria generadas de forma no covalente. Estos niveles superiores de conformación y organización de las proteínas se definen como las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de una proteína. La **estructura secundaria** se refiere al plegamiento tridimensional local de la cadena polipeptídica en la proteína. En este contexto, se entiende por cadena polipeptídica a los átomos unidos covalentemente por los enlaces peptídicos y por los enlaces de los carbonos α que mantienen unidos secuencialmente los residuos aminoácidos de la proteína. Las cadenas laterales no se consideran parte de la estructura secundaria. La **estructura terciaria** se refiere a la estructura tridimensional del polipéptido. Incluye las relaciones conformacionales en el espacio de las cadenas laterales y la relaciones geométricas entre regiones distantes de la cadena polipeptídica. La **estructura cuaternaria** se refiere a la asociación no covalente de subunidades polipeptídicas discretas en una proteína formada por múltiples subunidades. No todas las proteínas tienen estructura cuaternaria.

Por lo general, las proteínas adoptan una conformación secundaria, terciaria y cuaternaria única, denominada **conformación nativa**. El plegamiento de la estructura primaria en la conformación nativa ocurre habitualmente de forma espontánea bajo la influencia de fuerzas no covalentes. Esta conformación es la de menor energía libre de Gibbs cinéticamente accesible a la cadena o cadenas polipeptídicas en las condiciones concretas de fuerza iónica, pH y temperatura en que tiene lugar el proceso de plegamiento. Las proteínas denominadas chaperonas (véase p. 133) pueden aumentar la velocidad del plegamiento proteico.

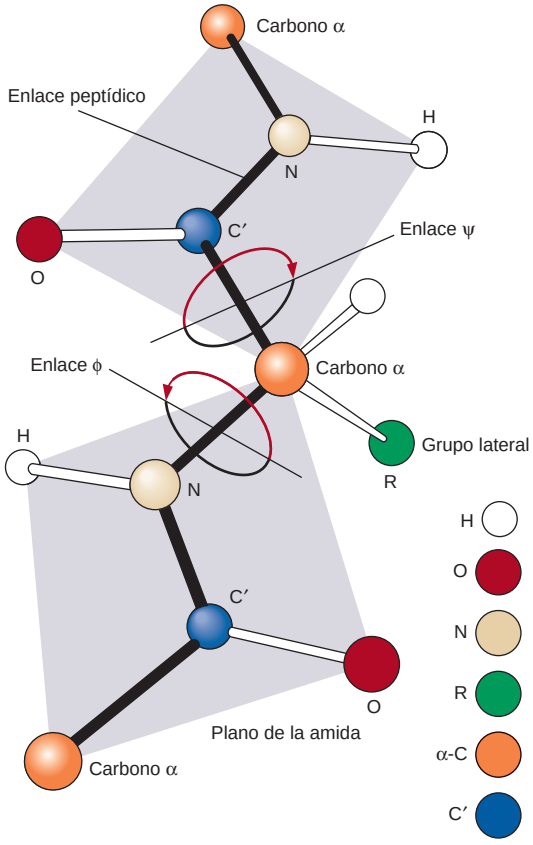


FIGURA 3.24
Cadena polipeptídica en la que se muestran ϕ, ψ y los enlaces peptídicos para el residuo R_i dentro de la cadena polipeptídica.
Reproducido con permiso de Dickerson, R. E. and Geis, I. The Structure and Action of Proteins. *Menlo Park, CA: Benjamin, 1969, p. 25.*

Las proteínas tienen estructura secundaria

La conformación de una cadena polipeptídica se puede describir por los ángulos de rotación alrededor de los enlaces covalentes que forman parte de la cadena. Estos enlaces, aportados por cada aminoácido, se establecen entre (1) el nitrógeno y el carbono α, y (2) el carbono α y el carbono del carbonilo. El primero de estos enlaces se denomina **enlace fi (ϕ)**, y el segundo **enlace psi (ψ)** de un residuo aminoácido en una cadena polipeptídica (Figura 3.24). El tercer enlace que aporta cada uno de los aminoácidos de la cadena polipeptídica es el enlace peptídico. Como se ha mencionado anteriormente, debido al carácter de doble enlace parcial de los enlaces C′⋯N, existe una barrera para la libre rotación alrededor del enlace peptídico.

Los segmentos de **estructura secundaria regular** de una cadena polipeptídica tienen todos los ángulos ϕ y ψ iguales. En la Tabla 3.9 se muestran los ángulos de rotación de los enlaces ϕ y ψ para estructuras secundarias regulares comunes.

TABLA 3.9 Parámetros de la hélice en estructuras secundarias regulares.

Estructura	*Ángulos de enlace aproximados* (°) ϕ	ψ	*Residuos por vuelta*, n	*Paso de la hélice,*[a] p (Å)
Hélice α dextrógira [hélice $3{,}6_{13}$)	−57	−47	3,6	5,4
Hélice3_{10}	+49	−26	3,0	6,0
Hoja β paralela	−119	+113	2,0	6,4
Hoja β antiparalela	−139	+135	2,0	6,8
Poliprolina tipo II[b]	−78	+149	3,0	9,4

[a] Distancia entre vueltas que se repiten sobre una línea paralela al eje de la hélice.
[b] Tipo de hélice que se encuentra en las cadenas polipeptídicas de colágeno.

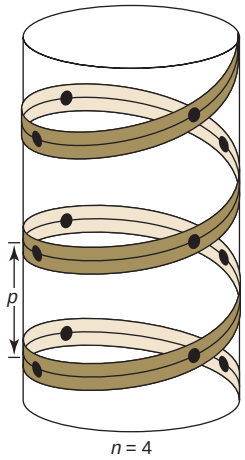


FIGURA 3.25
Paso de rosca (p) para una hélice con $n = 4$.
Cada círculo situado sobre la línea representa el carbono α de un residuo aminoácido. La translación por residuo será igual a p/n (véase la ecuación en el texto).
Reproducido con permiso de Dickerson, R. E. and Geis, I. The Structure and Action of Proteins. *Menlo Park, CA: Benjamin, 1969, p. 26.*

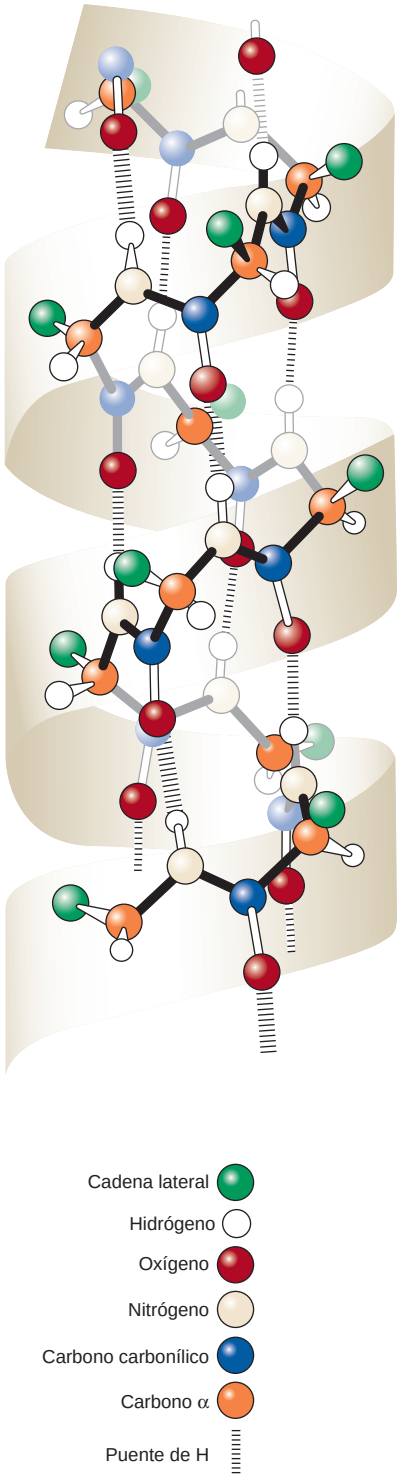


FIGURA 3.26
Una hélice α.
Reproducido con permiso, basada en una figura de Pauling, L. The Nature of the Chemical Bond, *3rd ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1960.*

Entre las estructuras secundarias regulares de las cadenas polipeptídicas, la hélice α y la estructura β son las conformaciones más estables termodinámicamente. Sin embargo, secuencias específicas pueden formar conformaciones regulares distintas de la hélice α y la estructura β. Además, hay regiones de estructura secundaria desordenada en las que los ángulos ϕ y ψ no son iguales. La prolina interrumpe las conformaciones en hélice α, ya que el grupo pirrolidina de la cadena lateral de la prolina interacciona estéricamente con el grupo de la cadena lateral del residuo que la precede, impidiendo la formación de la hélice α.

Las estructuras helicoidales de las cadenas polipeptídicas se caracterizan por el número (n) de residuos aminoácidos por vuelta de hélice y por la distancia entre los carbonos α de los aminoácidos adyacentes, medida paralelamente al eje de la hélice (d). Por lo tanto, el **paso de rosca** de la hélice (p), definido como el producto de $n \times d$, mide la distancia entre vueltas consecutivas de la hélice sobre una línea paralela al eje helicoidal (Figura 3.25):

$$p = n \times d$$

La estructura α-helicoidal

En la Figura 3.26 se muestra una secuencia de aminoácidos en configuración α-helicoidal. Se caracteriza por poseer 3,6 residuos aminoácidos por vuelta de 360° ($n = 3{,}6$). En la hélice α los planos del enlace peptídico son paralelos al eje de la hélice. Con esta geometría, cada grupo peptídico forma dos puentes de hidrógeno, uno con el enlace peptídico del cuarto residuo anterior y el otro con el enlace peptídico del cuarto aminoácido posterior en la estructura primaria. En la Tabla 3.9 se dan otros parámetros de la hélice α, como por ejemplo el paso de rosca (p). En los puentes de hidrógeno entre grupos peptídicos, la distancia entre el átomo dador del hidrógeno y el átomo aceptor del hidrógeno es de 2,9 Å. Además, el átomo dador, el átomo aceptor y el átomo de hidrógeno son aproximadamente colineales, es decir, se hallan en línea recta. Esta geometría y esa distancia son óptimas para una fuerza máxima del enlace de hidrógeno (véase la Sección 3.7).

En la hélice α, las cadenas laterales se encuentran en el exterior de la estructura en espiral generada por la cadena polipeptídica. Debido a los característicos 3,6 residuos por vuelta, el primero y cada tercer y cuarto grupo R de la secuencia de aminoácidos se encuentran próximos en la hélice. Las hélices presentan a menudo caras polares y no polares separadas, como consecuencia de la secuencia de aminoácidos, en que las cadenas laterales polares o no polares se repiten cada tres o cuatro aminoácidos. Esto da lugar a hélices con características funcionales únicas. Sin embargo, si cada tercera o cuarta cadena lateral que se pone en contacto con otra tiene carga del mismo signo o está ramificada en su carbono β (valina e iso-

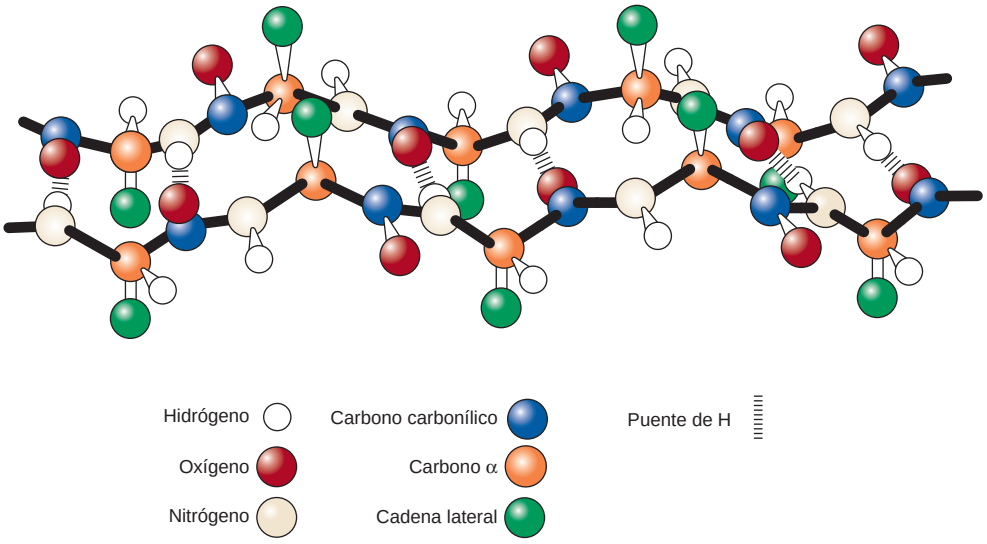


FIGURA 3.27
Dos cadenas polipeptídicas en estructura β.
Se pueden añadir otras cadenas polipeptídicas para generar una estructura más extensa.
Reproducido con permiso de Fersht, A. Enzyme Structure and Mechanism. *San Francisco: Freeman, 1977, p. 10.*

leucina), sus interacciones iónicas o estéricas desfavorables desestabilizan la estructura helicoidal. Teóricamente, la hélice α puede ser tanto dextrógira como levógira, confiriendo propiedades asimétricas a la hélice, junto con la propiedad asociada de actividad óptica. La estructura que se muestra es una hélice α dextrógira, que es más estable que la forma levógira.

La estructura β

Una cadena polipeptídica en conformación β (Figura 3.27) está unida por puentes de hidrógeno a otra región similar, alineada en dirección paralela o antiparalela para generar la **estructura β** (Figura 3.28). Las cadenas β unidas entre sí por puentes de hidrógeno tienen aspecto de hoja plegada (Figura 3.29). Las cadenas laterales se proyectan por encima y por debajo de la estructura en hoja plegada.

Motivos estructurales y plegamientos proteicos

En las estructuras proteicas plegadas pueden observarse ciertas combinaciones de elementos de estructura secundaria. Estas combinaciones pueden ser muy simples

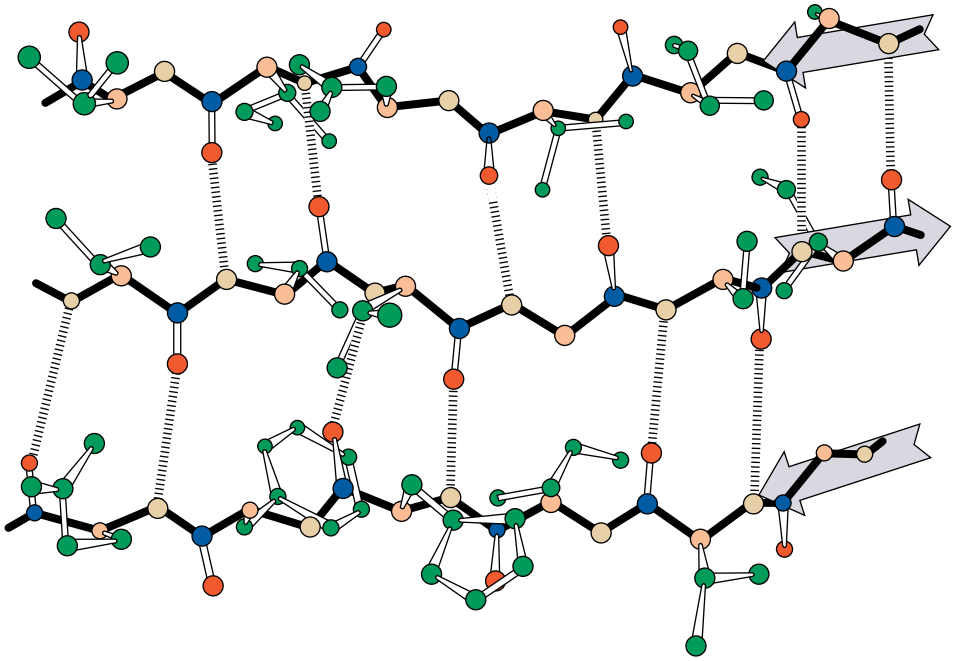


FIGURA 3.28
Ejemplo de estructura β antiparalela (residuos 93–98, 28–33 y 16–21 de la Cu, Zn superóxido dismutasa).
Las líneas punteadas representan los puentes de hidrógeno entre los oxígenos del carbonilo y los nitrógenos peptídicos; las flechas muestran la dirección de las cadenas polipeptídicas de N-terminal a C-terminal. En la estructura β antiparalela típica, pares de puentes de hidrógeno intercatenarios cercanos alternan con pares más alejados.
Reproducido con permiso de Richardson, J. S. Adv. Protein Chem. *34:168, 1981.*

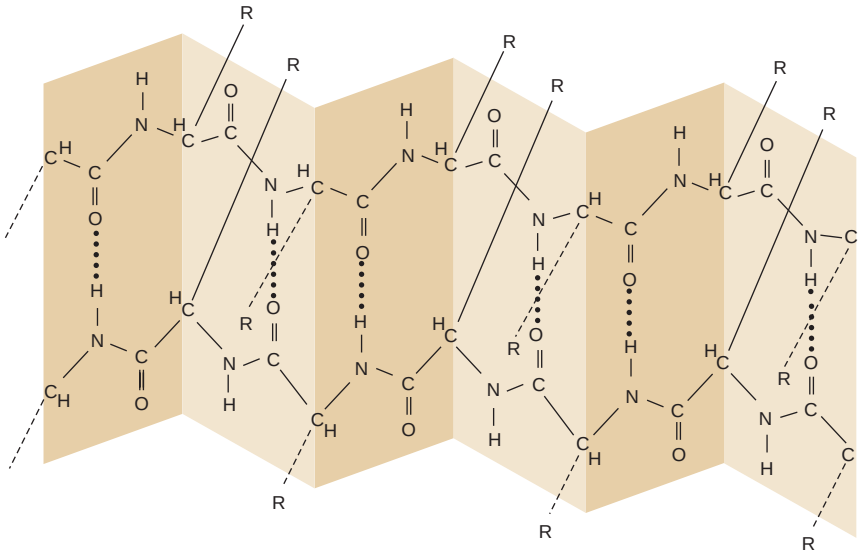


FIGURA 3.29
Estructura de hoja β plegada entre dos cadenas polipeptídicas.
Se pueden añadir otras cadenas polipeptídicas por encima y por debajo para generar una estructura más extensa

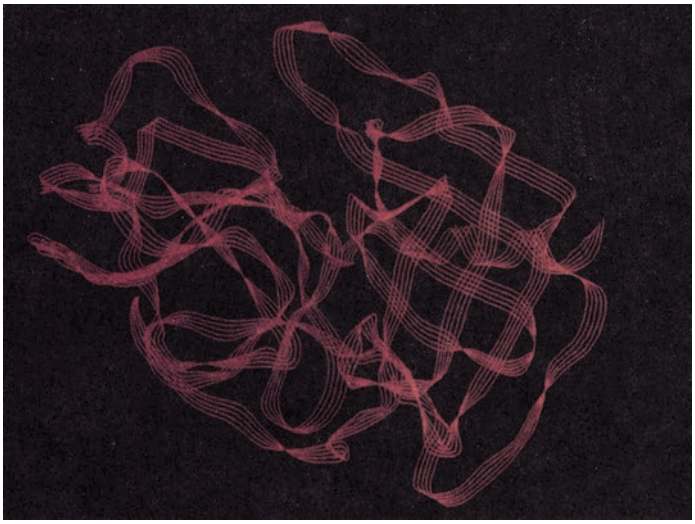
y se denominan **motivos estructurales**. Incluyen el motivo **hélice-giro-hélice** presente en muchas proteínas que se unen al DNA, el motivo **cadena β-giro-cadena β**, presente en proteínas con estructura β antiparalela y el motivo **cadena β-giro-hélice-giro-cadena β**, presente en muchas proteínas α, β. En estos motivos, el término giro designa pequeños segmentos del polipéptido (aproximadamente 3 ó 4 residuos) con estructura secundaria irregular que conectan segmentos de estructura secundaria regular, mientras que un bucle es un segmento de conexión más largo. La combinación de motivos o disposiciones más complejas de elementos de estructura secundaria pueden formar un **plegamiento**, que incluye el patrón de estructura secundaria de un dominio.

Las proteínas forman estructuras tridimensionales: estructura terciaria

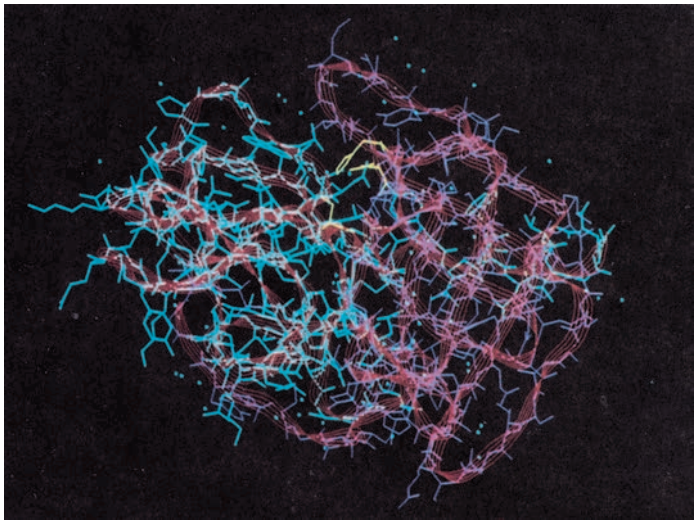
La **estructura terciaria** de un polipéptido describe la posición de cada uno de sus átomos en el espacio. Muestra la relación geométrica entre segmentos distantes de la estructura primaria y la relación espacial de las cadenas laterales entre sí. En la Figura 3.30 se muestra la tripsina como un ejemplo de estructura terciaria de una proteína. En la Figura 3.30*a*, la estructura de cinta muestra la conformación de la cadena polipeptídica y el patrón de plegamiento global de la cadena (estructura plegada). La estructura terciaria de la Figura 3-30*b* muestra la posición de las cadenas laterales. En amarillo se muestran las cadenas laterales catalíticas del centro activo, que incluyen el grupo hidroximetilo de la serina (residuo 177 en la secuencia), el imidazol de la histidina (residuo 40) y el carboxilato de la cadena lateral del aspartato (residuo 85). Si bien estos residuos catalíticos se encuentran muy separados en la estructura primaria, la estructura terciaria los aproxima para formar el sitio catalítico. En la Figura 3.30*c*, un modelo espacial muestra los átomos de C, N y O representados por bolas de radio proporcional a sus radios de van der Waals.

La estructura terciaria de la tripsina se ajusta a las reglas generales del plegamiento de proteínas (véase la Sección 3.3). Las cadenas laterales hidrofóbicas se encuentran generalmente en el interior de la estructura, lejos de la interfase con el agua. Las cadenas laterales ionizadas se encuentran en el exterior, donde están estabilizadas por el agua de solvatación. En el interior de la estructura proteica hay moléculas de agua (no representadas) en disposiciones específicas. Un gran número de moléculas de agua forma una capa de solvatación en el exterior de la proteína.

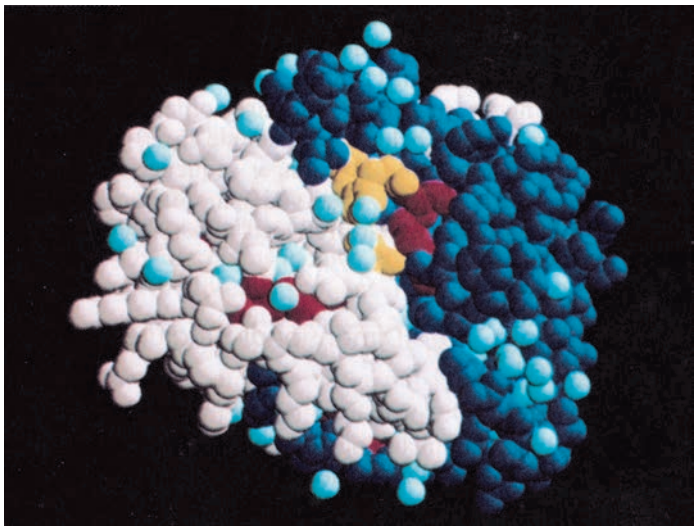
Las cadenas polipeptídicas largas se pliegan a menudo en múltiples regiones compactas semiindependientes o **dominios**. Los dominios poseen una estructura compacta característica, con un núcleo hidrofóbico y un exterior polar. Los dominios contienen habitualmente entre 100 y 150 aminoácidos consecutivos. Los dominios de una **proteína con múltiples dominios** pueden estar interconectados por un segmento de la cadena polipeptídica carente de estructura secundaria regular. Al-



(a)



(b)



(c)

FIGURA 3.30
Estructura terciaria de la tripsina.
(*a*) Modelo de cinta que muestra la conformación de la cadena polipeptídica. (*b*) La estructura muestra las cadenas laterales incluidos los residuos del sitio activo (en amarillo), con el contorno de la cadena polipeptídica (cinta) superpuesto. (*c*) Modelo espacial en el que el tamaño de cada átomo es proporcional al radio de van der Waals. No se muestran los átomos de hidrógeno. Los diferentes dominios se muestran en azul oscuro y blanco. Los residuos del sitio activo están en amarillo y los puentes disulfuro de cistina intracatenarios en rojo. Las esferas en azul claro representan moléculas de agua asociadas con la proteína. Este modelo muestra la densidad de empaquetamiento en el interior de la proteína.

ternativamente, las regiones esféricas densamente plegadas están separadas por una hendidura o por una región menos densa de la estructura terciaria (Figura 3.31). En la molécula de tripsina existen dos dominios plegados con una hendidura entre ellos que contiene el sitio catalítico de unión de sustrato de la proteína. La localización del sitio activo en una interfase entre dominios es característica de muchos enzimas. Los diferentes dominios de una proteína pueden moverse unos con respecto a otros. La hexoquinasa (Figura 3.32), que cataliza la fosforilación de glucosa por la adenosina trifosfato (ATP), tiene el sitio de unión de glucosa en una región entre dos dominios. Cuando la glucosa se une al centro activo, los dominios colindantes se cierran sobre el sustrato, atrapándolo para su fosforilación (Figura 3.32). En los enzimas con más de un sitio para sustratos o efectores alostéricos (véase p. 436), los diferentes sitios pueden encontrarse en diferentes dominios. En las proteínas multifuncionales, cada dominio desempeña una tarea diferente.

La bioinformática relaciona la estructura y la función de los productos génicos proteicos

La **bioinformática** es un área de investigación centrada en la integración y análisis de datos biológicos complejos mediante algoritmos de ordenador. Uno de los temas principales de la bioinformática ha sido la identificación de motivos en las secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos que pudieran ser de utilidad para la de-

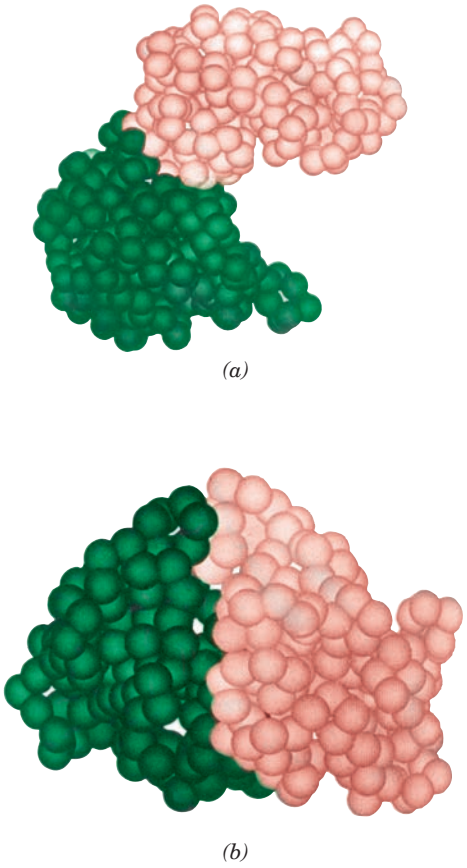


FIGURA 3.31
Dominios globulares en las proteínas.
(*a*) La fosfoglicerato quinasa tiene dos dominios separados por un "cuello" relativamente estrecho. (*b*) La elastasa posee dos dominios estrechamente asociados, separados por una estrecha hendidura. Cada esfera en el dibujo representa la posición del carbono α de cada aminoácido en la estructura de la proteína.
Reproducido con permiso de Richardson, J. S. Adv. Protein Chem. *34:168, 1981.*

terminación de las características estructurales y también de la familia o clase a que pertenecen los productos génicos. Estos algoritmos de búsqueda de homología se usan para identificar y clasificar los productos génicos en familias enzimáticas o proteicas según la similitud de las secuencias o, cuando se conoce la estructura, según la similitud de las estructuras. La búsqueda de similitud entre secuencias se basa en una diversidad de criterios, desde la identidad absoluta de secuencia a propiedades fisicoquímicas tales como el tamaño o la hidrofobicidad. Los algoritmos permiten la inserción o la deleción de segmentos de la cadena polipeptídica o de la estructura para optimizar el solapamiento de las dos proteínas.

Los dominios proteicos se clasifican según la clase, el plegamiento y la familia. La **clase** está determinada por el tipo de estructura secundaria predominante presente en la proteína. Algunos ejemplos de clases de proteínas son aquellas que contienen básicamente hélice α, básicamente estructura β y aproximadamente igual cantidad de hélice α y estructura β. La clasificación por **plegamiento** la determina la disposición de los elementos de estructura secundaria dentro del dominio. La clasificación por **familia** se basa en la identidad de secuencia entre las proteínas. Las proteínas pertenecientes a una misma familia tienen un origen evolutivo común; es decir, derivan del mismo gen primordial. Las proteínas de la misma familia tienen el mismo plegamiento y a menudo funciones similares.

El hallazgo de mutaciones limitadas de la secuencia de aminoácidos, que puedan causar alteraciones importantes de la función es de gran interés en medicina

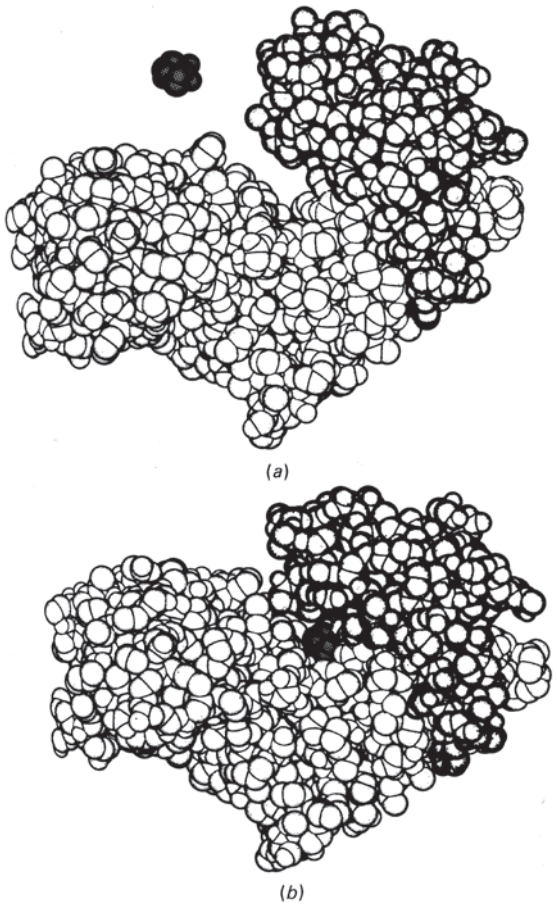


FIGURA 3.32
Representación de (*a*) la forma sin ligando de la hexoquinasa y la glucosa libre, y (*b*) conformación de la hexoquinasa con la glucosa unida.
En este modelo espacial, cada círculo representa el radio de van der Waals de un átomo en la estructura. La glucosa se representa en negro y cada dominio tiene un sombreado diferente.
Reproducido con permiso de Bennett, W. S. y Huber, R. CRC Rev. Biochem. *15:291, 1984.*
Copyright © 1984 CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

clínica. Las determinaciones bioquímicas muestran que cambios de incluso un solo aminoácido pueden ser significativos. Se han observado efectos de las mutaciones sobre la conformación nativa de la proteína, el número de estados de flexibilidad conformacional, la energética o movimiento dinámico de la molécula y la selectividad de las proteínas hacia sustratos e inhibidores. Un ejemplo muy bien estudiado es la hemoglobina, de la cual se dispone de un extenso catálogo de mutaciones puntuales. Algunas mutaciones de la hemoglobina provocan síntomas clínicos significativos, tal como la anemia falciforme, donde la sustitución de un único aminoácido induce la agregación de las moléculas de hemoglobina, que forman agregados que precipitan en el interior de los glóbulos rojos (véase la Apli. Clín. 3.3). Algunas posiciones de la secuencia de aminoácidos varían en las diferentes poblaciones. Estas posiciones en la secuencia, cuando implican cambios únicos en el codón de bases para el aminoácido, se denominan **polimorfismos de un solo nucleótido** (SNP), y pueden explicar las diferencias individuales en las manifestaciones de una misma enfermedad o la diferente respuesta a la terapia.

Estructuras con plegamientos homólogos están formadas a menudo por secuencias de aminoácidos no homólogas

Aunque cada estructura nativa es única, la comparación de la estructura terciaria de diferentes proteínas, resuelta por cristalografía de rayos X, muestra la presencia de disposiciones similares de motivos de estructura secundaria en la estructura plegada de los dominios. Los plegamientos de estructura similar en proteínas no relacionadas por su función, su secuencia o su evolución se denominan **superplegamientos**. Las estructuras de superplegamiento se forman gracias a la estabilidad termodinámica de sus patrones de estructura secundaria o a su accesibilidad cinética.

Un tipo común de **estructura secundaria todo-α** se encuentra en el enzima lisozima, y es conocido como plegamiento de globina (Figura 3.33). Otros ejemplos del plegamiento de globina se encuentran en la mioglobina y las subunidades de la hemoglobina, cuyas estructuras se describen en el Capítulo 9. Estas estructuras todo-α consisten en siete u ocho segmentos de hélice α unidos por segmentos más cortos de cadena polipeptídica que permiten que las hélices se plieguen sobre sí mismas y adquieran forma globular. El plegamiento de globina es un superplegamiento, pues se encuentra en proteínas de familias que no comparten homología de secuencia. El **dominio α,β** es otro superplegamiento común; en la triosa fosfato isomerasa (Figura 3.34), las cadenas (representadas por flechas) se enrollan formando un **barril β** central, con cada cadena β en el interior interconectada por regiones de hélice α en el exterior del plegamiento. En la piruvato quinasa se encuentra un plegamiento similar (Figura 3.34). Un tipo diferente de **superplegamiento de dominio α,β** se encuentra en la lactato deshidrogenasa y la fosfoglicerato quinasa (Fi-

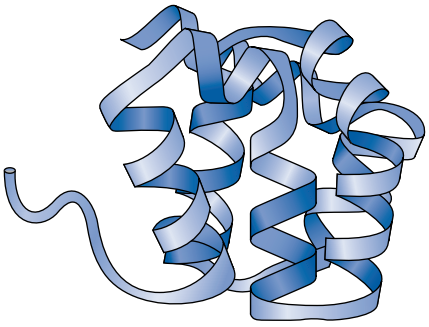
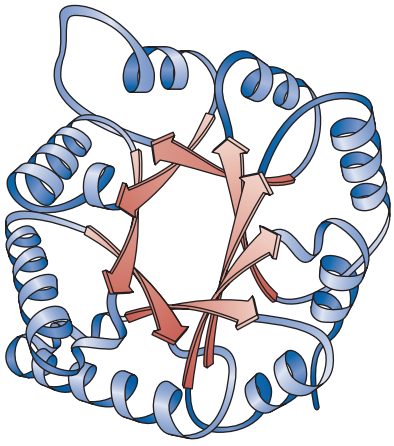
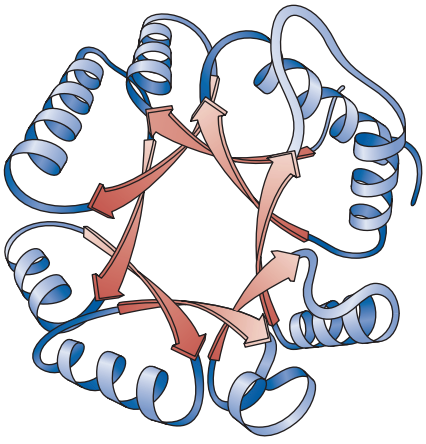


FIGURA 3.33
Ejemplo de un dominio todo α del tipo plegamiento de globina en el enzima lisozima.
En este dibujo y en los que siguen (figuras 3.34–3.36) sólo se representa la trayectoria de la cadena polipeptídica. Las cadenas con estructura β se representan por flechas, señalando en la dirección N $\rightarrow$ C terminal de la cadena; las líneas quebradas representan los puentes disulfuro y los círculos los iones metálicos (cuando los hay).
Reproducido con permiso de Richardson, J. S. Adv. Protein Chem. *34:168, 1981.*

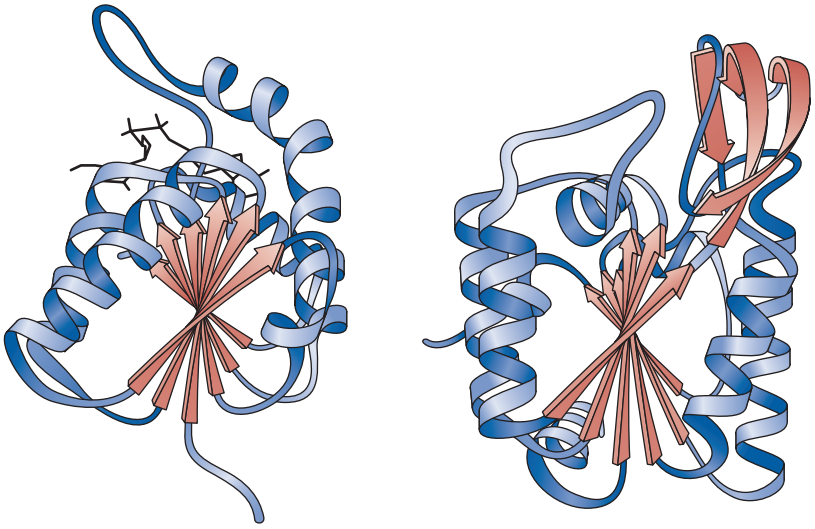


Triosa fosfato Isomerasa



Dominio 1 de la piruvato quinasa

FIGURA 3.34
Ejemplo de un dominio con plegamiento α,β en la triosa fosfato isomerasa.
Véase el pie de la Figura 3.33. En este común superplegamiento las cadenas β forman un barril β en el centro del dominio, mientras que los segmentos en hélice α se encuentran en el exterior del dominio. Las regiones en hélice α alternan con cadenas β en la cadena polipeptídica.
Reproducido con permiso de Richardson, J. S. Adv. Protein Chem. *34:168, 1981.*

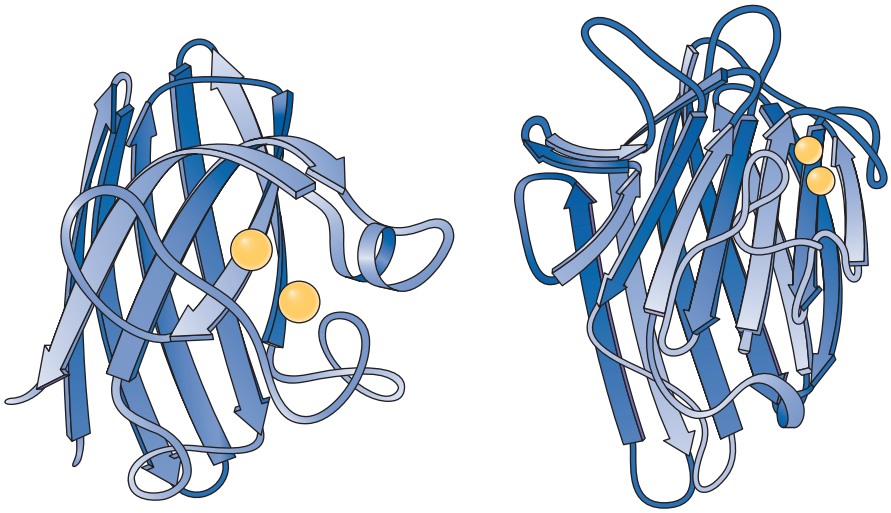


Dominio 1 de la lactato deshidrogenasa

Dominio 2 de la fosfoglicerato quinasa

FIGURA 3.35
Ejemplos de dominios con plegamiento α,β en los cuales las cadenas en estructura β adoptan la forma de una clásica hoja β retorcida en la lactato deshidrogenasa y la fosfoglicerato quinasa.
Véase el pie de la Figura 3.33. Como en el anterior dominio con plegamiento α,β, regiones de hélice α alternan con regiones de cadena β. La estructura en lámina β se encuentra en el interior mientras que los segmentos de hélice α están en el exterior. Las cadenas β de la estructura β son paralelas.
Reproducido con autorización de Richardson, J. S. Adv. Protein Chem. *34:168, 1981.*

gura 3.35). En estas proteínas, los segmentos interiores del polipéptido forman parte de una estructura en **hoja β retorcida**. De nuevo, los segmentos con estructura β están unidos por regiones de hélice α situadas en el exterior de la molécula. Una estructura de superplegamiento, el **dominio todo-β** puede observarse en la Cu, Zn superóxido dismutasa, en la cual la lámina β antiparalela forma un barril β de "llave griega" (Figura 3.36). Un patrón similar se encuentra en cada uno de los dominios de las inmunoglobulinas, que se estudiarán en el Capítulo 9. La **concanavalina A** (Figura 3.36) muestra una estructura de dominio todo-β en la cual los segmentos de estructura β antiparalela forman un plegamiento en barril β, denominado "rollo de gelatina". Las proteínas insolubles en agua pueden presentar diferentes patrones de plegamiento (véase la Sección 3.6).



Cu, Zn superóxido dismutasa

Concanavalina A

FIGURA 3.36
Ejemplos de dominios con plegamiento todo β (véase el pie de la Figura 3.33).
Las cadenas β son mayoritariamente antiparalelas en los dominios con plegamiento todo β.
Reproducido con autorización de Richardson, J. S. Adv. Protein Chem. *34:168, 1981.*

La estructura cuaternaria consiste en la asociación específica y no covalente de varias cadenas polipeptídicas

La estructura cuaternaria se refiere al ordenamiento de cadenas polipeptídicas en una proteína con múltiples cadenas. Las subunidades que forman la estructura cuaternaria deben encontrarse asociadas de manera no covalente. La α-quimotripsina contiene tres cadenas polipeptídicas unidas covalentemente entre sí mediante puentes disulfuro intercatenarios que forman una sola unidad covalente y, por lo tanto, no posee estructura cuaternaria. La mioglobina consiste en una sola cadena polipeptídica y, por tanto, no tiene estructura cuaternaria. Sin embargo, la hemoglobina A contiene cuatro cadenas polipeptídicas ($\alpha_2\beta_2$) unidas entre sí no covalentemente en una conformación específica necesaria para su función (véase el Capítulo 9). La hemoglobina, por tanto, tiene estructura cuaternaria. La aspartato transcarbamilasa (véase la p. 840) tiene una estructura cuaternaria formada por 12 subunidades polipeptídicas. La proteína de la cubierta del virus de la polio contiene 60 subunidades polipeptídicas y la proteína del virus del mosaico del tabaco tiene 2120 subunidades polipeptídicas unidas entre sí de forma no covalente.

3.6 OTROS TIPOS DE PROTEÍNAS

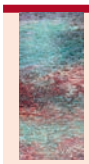
Las características de la estructura proteica que acabamos de describir están basadas en observaciones sobre proteínas globulares hidrosolubles. Otras proteínas, tales como las proteínas fibrosas, no son globulares y presentan una baja solubilidad en agua; las lipoproteínas y glucoproteínas contienen componentes no proteicos y pueden ser solubles o insolubles en agua.

El colágeno, la elastina, la α-queratina y la tropomiosina son proteínas fibrosas

Las **proteínas globulares** tienen forma esferoidal, masas moleculares variables, solubilidad en agua relativamente elevada y una variedad de papeles funcionales como catalizadores, transportadores y reguladores de rutas metabólicas y de la expresión génica. Por el contrario, las **proteínas fibrosas** tienen generalmente mayor proporción de estructura secundaria regular, forma cilíndrica alargada (tipo bastón), baja solubilidad en agua y un papel más estructural que dinámico en la célula o en el organismo. Ejemplos de proteínas fibrosas son el colágeno, la elastina, la α-queratina y la tropomiosina.

Distribución del colágeno en el cuerpo humano

El **colágeno** se encuentra en todos los tejidos y órganos a los que proporciona el armazón que les da forma y resistencia estructural. La elevada concentración de colágeno en todos los órganos pone de manifiesto su importancia; el porcentaje de colágeno, en peso, en algunos tejidos y órganos representativos es del 4% en el hígado, 10% en el pulmón, 12-24% en la aorta, 50% en el cartílago, 64% en la córnea, 23% en el hueso cortical entero y 74% en la piel (véase la Apli. Clín. 3.4).

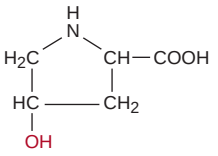


APLICACIÓN CLÍNICA 3.4

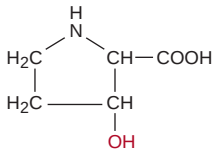
Síntomas de las enfermedades relacionadas con una síntesis anormal de colágeno

El colágeno se encuentra en prácticamente todos los tejidos y es la proteína más abundante en los seres humanos. El funcionamiento fisiológico de determinados órganos depende en gran medida de la estructura normal del colágeno. La síntesis y la estructura anómalas del colágeno provoca disfunciones de los órganos cardiovasculares (aneurisma aórtico y arterial y mal funcionamiento de las válvulas cardíacas), huesos (fragilidad y propensión a las fracturas), piel (cicatrización defectuosa y distensión inusual), articulaciones (hipermovilidad y artritis), y ojos (dislocación del cristalino). Entre las enfermedades provocadas por una síntesis anormal del colágeno se encuentran el síndrome de Ehlers–Danlos, la osteogénesis imperfecta y el escorbuto. Estas enfermedades pueden ser consecuencia de genes del colágeno anormales, modificación postraducción anormal del colágeno, o deficiencia de cofactores necesarios para los enzimas que llevan a cabo la modificación postraducción del colágeno.

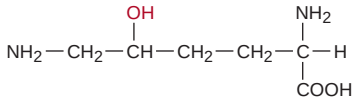
Byers, P. H. Disorders of collagen biosynthesis and structure. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, Chap. 134.



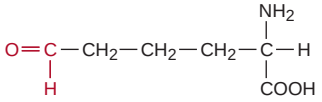
4-Hidroxiprolina



3-Hidroxiprolina



5-Hidroxilisina



Al-lisina

FIGURA 3.37
Derivados de aminoácidos presentes en el colágeno.
En la 5-hidroxilisina, el glúcido se une con el 5-OH a través de un enlace glucosídico de tipo III (véase la Figura 3.45).

Composición de aminoácidos del colágeno

En la Tabla 3.10 se presenta la composición de aminoácidos del colágeno de tipo I de la piel y de las proteínas globulares ribonucleasa y hemoglobina. El colágeno de la piel es rico en **glicina** (33% de los aminoácidos), **prolina** (13%), en los aminoácidos derivados **4-hidroxiprolina** (9%) y **5-hidroxilisina** (0,6%) (Figura 3.37). La hidroxiprolina es exclusiva de los colágenos; se forma enzimáticamente a partir de prolinas que forman parte del colágeno. La reacción enzimática de hidroxilación de la prolina requiere ácido ascórbico (vitamina C); por tanto, la síntesis de colágeno nuevo es baja en personas con deficiencia de vitamina C (**escorbuto**). La mayor parte de las hidroxiprolinas del colágeno tienen el grupo hidroxilo en la posición 4 (carbono γ) de la estructura de la prolina, aunque también se forma una pequeña cantidad de 3-hidroxiprolina (Tabla 3.10). Los colágenos son glucoproteínas con la porción glucídica unida covalentemente al aminoácido derivado 5-hidroxilisina mediante un enlace *O*-glucosídico a través del grupo hidroxilo del carbono δ. La formación de 5-hidroxilisina a partir de lisina y la adición del glúcido tienen lugar después de la formación de la cadena polipeptídica, pero antes del plegamiento superhelicoidal de las cadenas de colágeno.

Secuencia de aminoácidos del colágeno

Cada molécula de colágeno maduro o de tropocolágeno contiene tres cadenas polipeptídicas. Existen varios tipos distintos de colágeno, cada uno con sus propios genes, que forman cadenas polipeptídicas características. En algunos tipos de colágeno las tres cadenas polipeptídicas tiene la misma secuencia de aminoácidos. En otros, tales como el tipo I (Tabla 3.11), dos cadenas son idénticas, mientras que la secuencia de la tercera cadena es ligeramente distinta. En el colágeno de tipo I, las dos cadenas idénticas se designan como cadenas α1(I) y la tercera cadena no idén-

TABLA 3.10 Comparación del contenido de aminoácidos del colágeno de piel humana (tipo I) y de la elastina madura con el de dos proteínas globulares típicas[a]

Aminoácido	*Colágeno (piel humana)*	*Elastina (mamífero)*	*Ribonucleasa (bovina)*	*Hemoglobina (humana)*
AMINOÁCIDOS COMUNES		PORCENTAJE DEL TOTAL		
Ala	11	22	8	9
Arg	5	0,9	5	3
Asn			8	3
Asp	5	1	15	10
Cys	0	0	0	1
Glu	7	2	12	6
Gln			6	1
Gly	33	31	2	4
His	0,5	0,1	4	9
Ile	1	2	3	0
Leu	2	6	2	14
Lys	3	0,8	11	10
Met	0,6	0,2	4	1
Phe	1	3	4	7
Pro	13	11	4	5
Ser	4	1	11	4
Thr	2	1	9	5
Trp	2	1	9	2
Tyr	0,3	2	8	3
Val	2	12	8	10
AMINOÁCIDOS DERIVADOS				
Cistina	0	0	7	0
3-Hidroxiprolina	0,1		0	0
4-Hidroxiprolina	9	1	0	0
5-Hidroxilisina	0,6	0	0	0
Desmosina e isodesmosina	0	1	0	0

[a] Los números en recuadro ponen de relieve diferencias importantes en la composición de aminoácidos entre las proteínas fibrosas (colágeno y elastina) y las proteínas globulares típicas.

tica como α2(I). En el colágeno de tipo V, las tres cadenas son diferentes y se designan por α1(V), α2(V) y α3(V). Los diferentes tipos de colágeno difieren en sus propiedades físicas a causa de diferencias en la secuencia de aminoácidos, aún cuando existen amplias regiones de secuencia homóloga entre los diferentes tipos de cadena. El colágeno contiene glúcidos unidos covalentemente, por lo que los tipos de colágeno difieren en su componente glucídico. La Tabla 3.11 describe alguna de las características de los colágenos de tipo I–VI; se han descrito otros tipos de colágeno (designados hasta el tipo XIX).

La secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de los colágenos es peculiar. En largos segmentos de todos los tipos de colágeno la glicina se repite cada tres residuos, y en las mismas regiones se encuentran también prolina e hidroxiprolina cada tres residuos. En consecuencia, las secuencias de aminoácidos Gly-Pro-Y y Gly-X-Hyp (donde X e Y son cualquier aminoácido) se repiten en tándem varios centenares de veces. En el colágeno de tipo I los tripletes se repiten más de 200 veces, abarcando más de 600 aminoácidos de los aproximadamente 1000 aminoácidos del polipéptido.

Estructura del colágeno

En el laboratorio se pueden sintetizar polipéptidos que contienen solamente prolina. Estas cadenas de poliprolina adoptan una estructura secundaria regular en solución acuosa, consistente en una hélice extendida muy enrollada, con tres residuos por vuelta ($n = 3$). Esta hélice con todos los enlaces peptídicos en *trans* se designa como hélice de **poliprolina tipo II** (las diferencias entre enlaces peptídicos *cis* y *trans* se muestran en la Figura 3.11). La hélice de poliprolina tiene las mismas características que las hélices del colágeno, en las que la estructura primaria contiene una prolina o una hidroxiprolina aproximadamente en cada tercera posición. Ello indica que las fuerzas termodinámicas que conducen a la formación de la hélice del colágeno se deben a las propiedades de la prolina. En la prolina, el ángulo ϕ de la cadena polipeptídica forma parte de la cadena lateral cíclica de cinco átomos. Ello restringe el enlace C_α—N a un ángulo compatible con la hélice de la poliprolina.

TABLA 3.11 Clasificación de los tipos de colágeno

Tipo	*Designación de las cadenas*	*Tejido*	*Características*
I	$[\alpha1(I)]_2\alpha2(I)$	Huesos, piel, tendones, tejido cicatrizado, válvula cardíaca, pared intestinal y uterina	Poco glúcido; < 10 hidroxilisinas por cadena; 2 tipos de cadenas polipeptídicas
II	$[\alpha1(II)]_3$	Cartílago, vítreo	10% glúcido; >20 hidroxilisinas por cadena
III	$[\alpha1(III)]_3$	Vasos sanguíneos, piel de recién nacido, cicatrices, pared intestinal y uterina	Poco glúcido; alto contenido en hidroxiprolina y Gly; contiene Cys
IV	$[\alpha1(IV)]_3$ $[\alpha2(IV)]_3$	Membrana basal, cristalino	Alto contenido en 3-hidroxiprolina; >40 hidroxilisinas por cadena; poca Ala y Arg; contiene Cys; alto contenido en glúcidos (15%)
V	$[\alpha1(V)]_2\alpha2(V)$ $[\alpha1(V)]_3$ $\alpha1(V)\alpha2(V)\alpha3(V)$	Superficies celulares y exocitoesqueleto; ampliamente distribuido en pequeñas cantidades	Contenido elevado de glúcidos, relativamente elevado de glicina e hidroxilisina
VI	—	Intima de la aorta, placenta, riñón y piel en pequeñas cantidades	En la región telopeptídica dominios globulares relativamente grandes; Cys y Tyr elevados; masa molecular relativamente baja (~160 000); cantidades equimolares de hidroxilisina e hidroxiprolina

En la hélice de poliprolina tipo II, el plano de cada enlace peptídico es perpendicular al eje de la hélice. Con esta geometría, los grupos carbonilo apuntan hacia las cadenas vecinas y están orientados correctamente para formar puentes de hidrógeno intercatenarios fuertes con otras cadenas helicoidales de poliprolina. Por el contrario, en la hélice α el plano que contiene los átomos del enlace peptídico es paralelo al eje de la hélice, y los enlaces peptídicos forman solamente puentes de hidrógeno intracatenarios con enlaces peptídicos de la misma cadena polipeptídica. Las tres cadenas de una molécula de colágeno, cada una con conformación de hélice de poliprolina tipo II, se enrollan cada una alrededor de las otras de tal manera que forman una **estructura superhelicoidal** (Figura 3.38). Al igual que las hélices de cadena sencilla, las tres cadenas de la superhélice tienen una translación por residuo (d) y un paso de rosca (p) característicos. La superhélice del colágeno se forma porque los restos de glicina tienen una cadena lateral con un volumen estérico pequeño (R = H). Dado que la hélice de poliprolina tipo II tiene tres residuos por vuelta ($n = 3$), y que la glicina está en cada tercera posición, las glicinas de cada una de las cadenas polipeptídicas se colocan del mismo lado de la hélice, formando un **borde apolar**. Los bordes de glicina de las tres cadenas polipeptídicas se asocian de forma no covalente, formando una estructura compacta que se mantiene por interacciones hidrofóbicas,

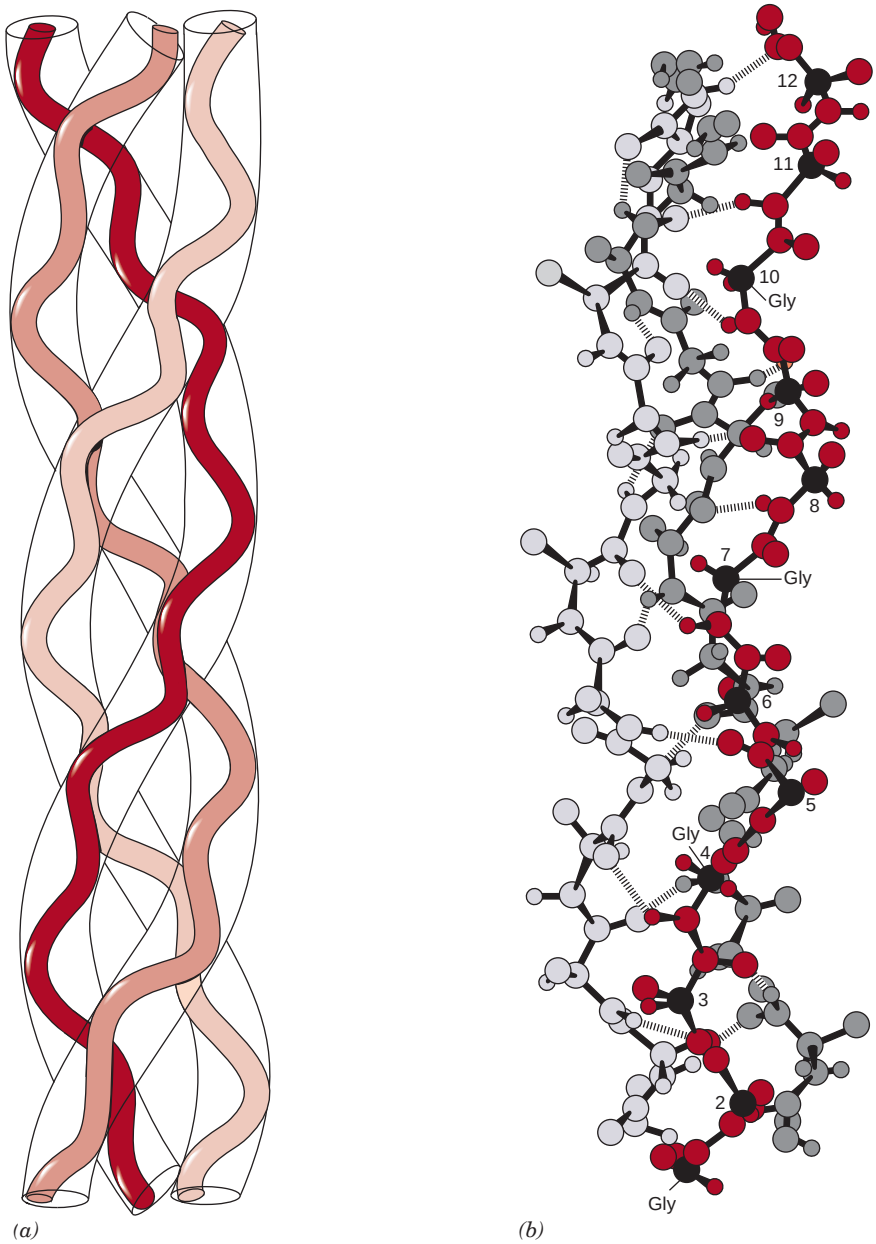


FIGURA 3.38
Diagrama del colágeno en el que se demuestra la necesidad de una glicina cada tres residuos para permitir que las diferentes cadenas estén muy próximas entre sí en la estructura.
(*a*) Modelo de cinta de la estructura superenrollada del colágeno con cada una de las cadenas individuales en forma de hélice de poliprolina tipo II. (*b*) Modelo más detallado de la configuración superenrollada. Todos los carbonos α están numerados, y los puentes de hidrógeno propuestos se representan por rayas a trazos.
Reproducido con autorización de Dickerson, R. E. y Geis, I. The Structure and Actions of Proteins. *Menlo Park, CA: Benjamin, 1969, pp. 41, 42.*

y que constituye la estructura superhelicoidal del colágeno. Una cadena lateral con un grupo mayor que la glicina impediría que las cadenas adyacentes se aproximaran suficientemente para formar la estructura superenrollada (Figura 3.38).

En el colágeno, la superhélice puede abarcar grandes fragmentos de la secuencia, especialmente en el colágeno de tipo I, en el cual sólo los segmentos COOH y NH_2 terminales (conocidos como **telopéptidos**) no adoptan la conformación superhelicoidal. La molécula del colágeno tipo I tiene una longitud de 3000 Å y una anchura de sólo 15 Å; tiene, pues, una estructura cilíndrica muy alargada. En otros tipos de colágeno, las regiones superhelicoidales pueden estar interrumpidas periódicamente por regiones globulares.

Formación de enlaces covalentes cruzados en el colágeno

Un enzima extracelular (véase la p. 269) actúa sobre las moléculas de colágeno secretado y convierte algunos grupos ε-amino de las cadenas laterales de la lisina en δ-aldehídos (Figura 3.39). El aminoácido derivado resultante, que contiene un grupo R aldehído, se conoce como **al-lisina**. La cadena lateral aldehído recién formada sufre espontáneamente reacciones de adición nucleofílica con grupos ε-amino no modificados de otras lisinas y también con el carbono δ de la cadena lateral de otros grupos aldehído de al-lisinas, formando así puentes covalentes (Figura 3.39). Estas uniones covalentes pueden establecerse entre cadenas dentro de la estructura superhelicoidal, o bien entre moléculas de colágeno superhelicoidal adyacentes en una fibrilla de colágeno.

La elastina es una proteína fibrosa con entrecruzamientos generados por al-lisina

La **elastina** confiere a los tejidos y órganos la capacidad de estirarse sin llegar a desgarrarse. Debido a su función estructural y a su relativa insolubilidad, la elastina se clasifica como proteína fibrosa. Es abundante en ligamentos, pulmones, paredes arteriales y piel. La elastina no contiene secuencias Gly-Pro-Y y Gly-X-Hyp repetidas y no se pliega formando hélices de poliprolina o superhélices. Carece de estructura secundaria regular, pero presenta una estructura enrollada al azar en la cual los residuos de aminoácidos dentro de la estructura plegada son altamente móviles. Esta estructura cinéticamente libre, aunque extensamente entrecruzada, confiere a la proteína una elasticidad parecida a la del caucho. En la elastina, al igual que en el colágeno, las al-lisinas forman entrecruzamientos. Una **lisina aminooxidasa** extracelular convierte las cadenas laterales de lisina en al-lisina. La aminooxidasa es específica de las lisinas de las secuencias -Lys-Ala-Ala-Lys- y -Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-.

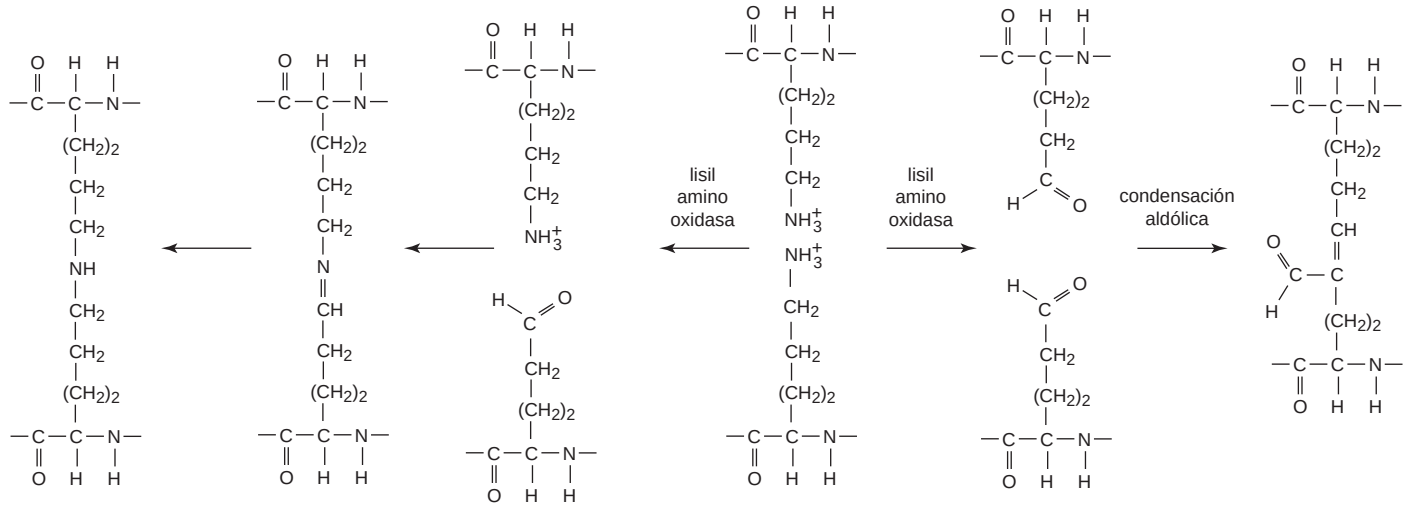


FIGURA 3.39
Entrecruzamientos covalentes en el colágeno a través de intermedios de al-lisina.
La formación de al-lisinas está catalizada por la lisil amino oxidasa.

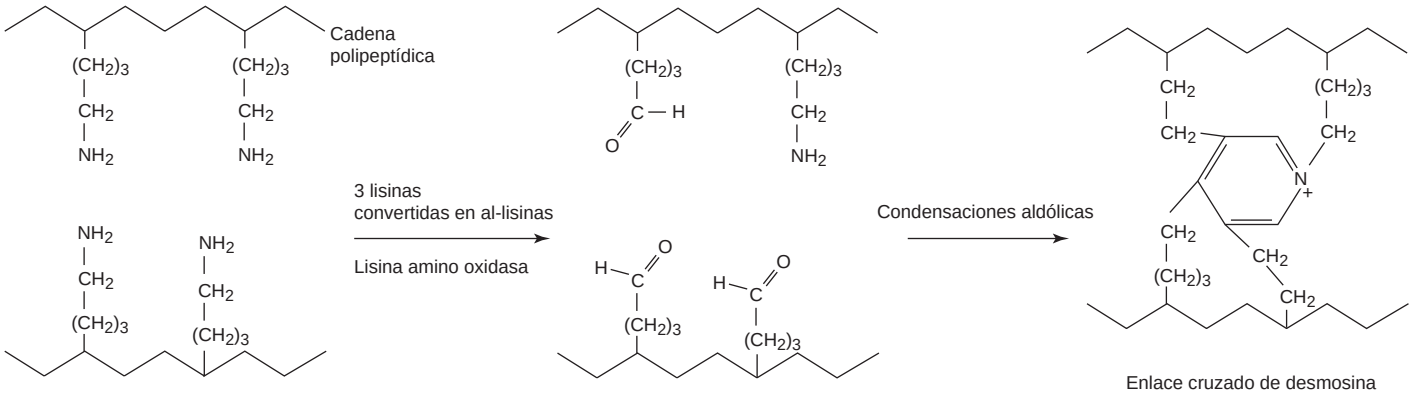


FIGURA 3.40
Formación de entrecruzamientos covalentes de desmosina en la elastina a partir de lisina y al-lisina.
La cadena polipeptídica está dibujada esquemáticamente; los carbonos α están situados en la intersección de las líneas.

Tres al-lisinas y una lisina no modificada de estas secuencias pertenecientes a regiones diferentes de las cadenas polipeptídicas reaccionan formando la estructura heterocíclica de la **desmosina** o de la **isodesmosina**. Las desmosinas entrecruzan covalentemente las cadenas polipeptídicas de las fibras de elastina (Figura 3.40).

α-Queratina y tropomiosina

La **α-queratina** y la **tropomiosina** son proteínas fibrosas en las que cada una de las cadenas tiene conformación en hélice α. La α-queratina se encuentra en la capa epidérmica de la piel, en las uñas y en el pelo. La tropomiosina es un componente del filamento delgado del tejido muscular. Las secuencias de ambas proteínas muestran segmentos repetitivos de siete aminoácidos, de los cuales el primero y el cuarto tienen cadenas laterales hidrofóbicas, y el quinto y el séptimo cadenas laterales polares. La repetición de cadenas laterales hidrofóbicas y polares en los segmentos de siete aminoácidos se representa simbólicamente por $(a\text{-}b\text{-}c\text{-}d\text{-}e\text{-}f\text{-}g)_i$, donde a y d son aminoácidos hidrofóbicos y e y g cadenas laterales con grupos polares o ionizados. Dado que un segmento de siete aminoácidos representa aproximadamente dos vueltas completas de hélice α ($n = 3{,}6$), los residuos apolares en a y d se alinean formando un borde apolar a lo largo de un lado de la hélice α (Figura 3.41). El borde apolar interacciona con bordes similares de otras cadenas de α-queratina, formando una estructura superhelicoidal con dos o tres cadenas polipeptídicas. Cada cadena presenta también un borde polar, debido a los residuos e y g, que interacciona con el agua en el exterior de la superhélice, y que también estabiliza la estructura superhelicoidal. De forma similar, dos polipéptidos de tropomiosina en conformación de hélice α se enrollan uno alrededor del otro formando la estructura superhelicoidal de la tropomiosina.

Así pues, las moléculas de colágeno, α-queratina y tropomiosina son estructuras multihebra, cuyas cadenas polipeptídicas poseen una estructura secundaria altamente regular (hélice de poliprolina tipo II o hélice α) y que adoptan conformaciones superhelicoidales en forma de bastón. A su vez, las moléculas superenrolladas están alineadas en fibras formadas por múltiples moléculas, estabilizadas a veces por enlaces covalentes cruzados. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas son repetitivas, lo que genera sobre la superficie cilíndrica de cada una de las cadenas bordes que estabilizan las interacciones hidrofóbicas necesarias para obtener la conformación superenrollada.

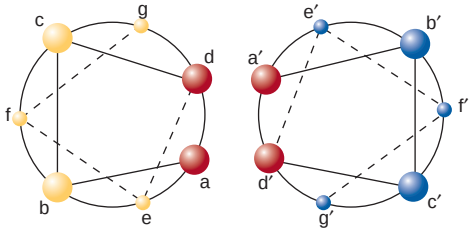
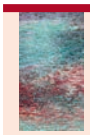


FIGURA 3.41
Interacción de los bordes apolares de dos cadenas en configuración α-helicoidal en la α-queratina y la tropomiosina.
Interacción de los residuos apolares d-a y a′-d de dos hélices α alineadas paralelamente en dirección NH_2-terminal (parte superior) a COOH-terminal.
Reproducido de McLachlan, A. D. and Stewart, M. J. Mol. Biol. *98:293, 1975.*



APLICACIÓN CLÍNICA 3.5
Hiperlipidemias

Las hiperlipidemias son alteraciones de la velocidad de síntesis o de eliminación de las lipoproteínas de la circulación sanguínea. Normalmente se detectan midiendo los triacilgliceroles y el colesterol plasmáticos, y se clasifican según la clase de lipoproteína que presenta un nivel elevado.

La hiperlipidemia del tipo I se debe a la acumulación de quilomicrones. Se conocen dos formas genéticas: la deficiencia de lipoproteína lipasa y la deficiencia de ApoC-II. Esta última es necesaria para la máxima actividad de la lipoproteína lipasa. Los pacientes con hiperlipidemia de tipo I presentan niveles de triacilgliceroles plasmáticos extremadamente elevados (más de 1000 mg/dl) y sufren xantomas eruptivos (depósitos de triacilgliceroles en la piel) y pancreatitis.

La hiperlipidemia del tipo II se caracteriza por valores elevados de LDL. La mayor parte de los casos se deben a defectos genéticos en la síntesis, la maduración o la función del receptor de LDL. Los heterocigotos tienen niveles de LDL elevados, por tanto se trata de un carácter dominante. Los pacientes homocigóticos presentan niveles de LDL muy elevados, y pueden sufrir infartos de miocardio antes de los 20 años de edad.

La hiperlipidemia de tipo III se debe a anomalías de la ApoE, que interfieren en la incorporación de los quilomicrones y los residuos de VLDL. El hipotiroidismo puede causar una hiperlipidemia muy similar. Estos pacientes corren un riesgo mayor de aterosclerosis.

La hiperlipidemia del tipo IV es la más común. Los niveles de VLDL están incrementados, a menudo a causa de la obesidad, el abuso de alcohol o la diabetes. También se conocen formas familiares de hiperlipidemia, pero se desconoce el defecto genético.

La hiperlipidemia de tipo V está, como la de tipo I, asociada a niveles elevados de triacilgliceroles en los quilomicrones, pancreatitis y xantomas eruptivos.

La hipercolesterolemia también se produce en determinados tipos de enfermedades hepáticas en las que está disminuida la excreción biliar de colesterol. Se acumula una lipoproteína anormal denominada lipoproteína X. Esta enfermedad no está asociada con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular por aterosclerosis.

Havel, R. J. y Kane, J. P. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, Cap. 56; and Goldstein, J. L., Hobbs, H. H., and Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, Cap. 62.

Las lipoproteínas plasmáticas son complejos de lípidos y proteínas

Las **lipoproteínas** son complejos con múltiples componentes proteicos y lipídicos que forman distintos agregados moleculares, con una estequiometría aproximada entre los componentes proteico y lipídico del complejo. Cada tipo de lipoproteína tiene una masa molecular, un tamaño, una composición, una densidad y un papel fisiológico característicos. La proteína y el lípido se mantienen unidos mediante fuerzas no covalentes.

Las **lipoproteínas plasmáticas** están muy bien caracterizadas. Los cambios en su concentración relativa permiten diagnosticar una importante enfermedad humanas, la aterosclerosis (véase Apli. Clín. 3.5). Entre otras funciones, las lipoproteínas transportan lípidos entre los tejidos a través de la sangre y participan en el metabolismo lipídico (véase la p. 745). En seres humanos normales en ayunas hay cuatro clases de lipoproteínas plasmáticas (Tabla 3.12); en el período posterior a la absorción también se halla presente un quinto tipo de lipoproteína plasmática, los quilomicrones. Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo con su densidad, determinada por ultracentrifugación y por electroforesis (Figura 3.42). Los componentes proteicos de una partícula de lipoproteína se denominan **apolipoproteínas**. Cada tipo de lipoproteína tiene una composición de apolipoproteína característica; a menudo las diferentes apolipoproteínas están presentes en una proporción definida. La apolipo-

TABLA 3.12 Clases densitométricas hidratadas de las lipoproteínas plasmáticas

Fracción de lipoproteína	*Densidad (g mL^{-1})*	*Tasa de flotación S_f (Unidades Svedberg)*	*Masa molecular (daltons)*	*Diámetro de partícula (Å)*
HDL	1,063–1,210		HDL_2, 4×10^5	70−130
			HDL_3, 2×10^5	50−100
LDL (o LDL_2)	1,019–1,063	0–12	2×10^6	200−280
IDL (o LDL_1)	1,006–1,019	12–20	$4{,}5 \times 10^6$	250
VLDL	0,95–1,006	20–400	5×10^6−10^7	250−750
Quilomicrones	<0,95	>400	10^9−10^{10}	10^3−10^4

Datos de Soutar, A. K. y Myant, N. B. En: R. E. Offord (Ed.), *Chemistry of Macromolecules,* IIB. Baltimore, MD: University Park Press, 1979.

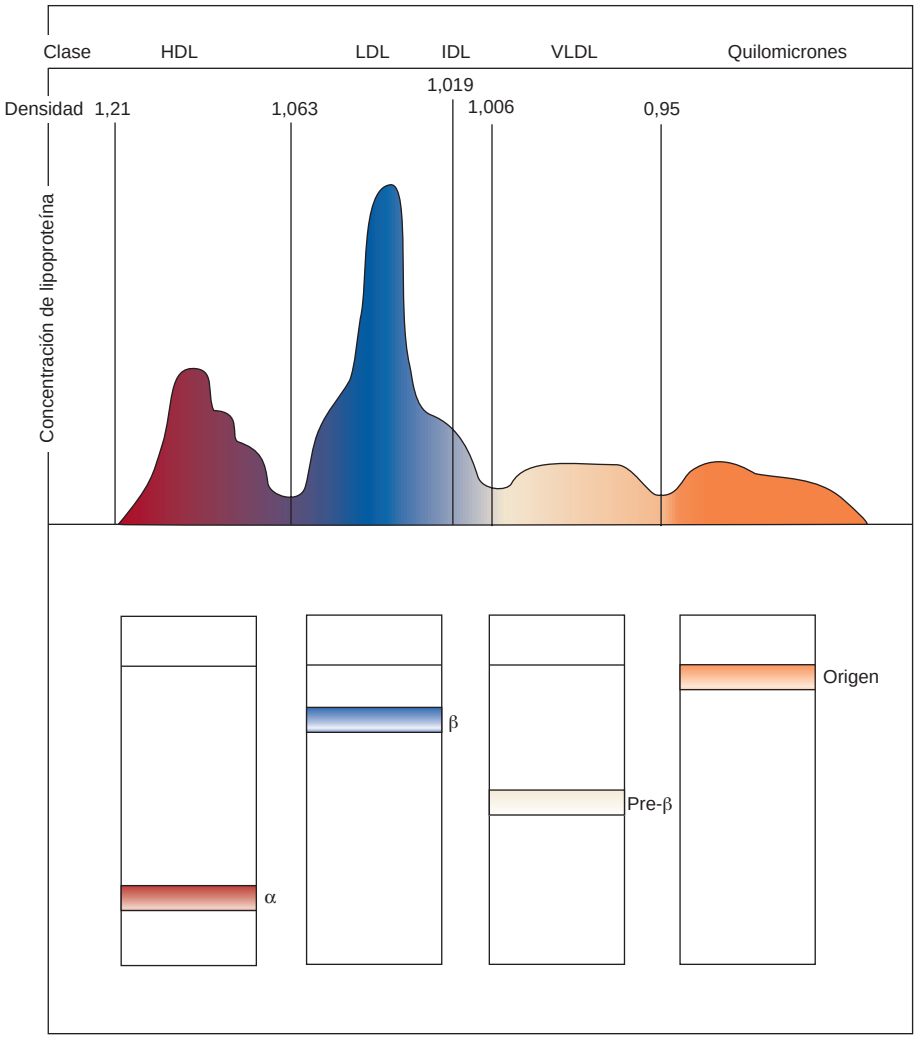
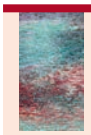


FIGURA 3.42
Correspondencia de las clases de lipoproteínas plasmáticas según su densidad con la movilidad electroforética.
En el diagrama superior se muestran el patrón de ultracentrifugación de Schlieren. En el inferior, la electroforesis sobre un soporte de papel muestra las movilidades de las principales clases de lipoproteínas plasmáticas en relación con las bandas de las globulinas α y β.
Reproducido con autorización de Soutar, A. K. y Myant, N. B. En: R. E. Offord (Ed.), Chemistry of Macromolecules, *IIB. Baltimore, MD: University Park Press, 1979.*

proteína más abundante en las **lipoproteínas de alta densidad (HDL)** es la apolipoproteína A-I (**apoA-I**) (Tabla 3.13). Las **lipoproteínas de baja densidad (LDL)** contienen **apoB**, que también se encuentra en las **lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)** y en las **lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)**. La familia **apoC** también se encuentra a altas concentraciones en las IDL y VLDL. Cada una de las clases de apolipoproteína (A, B, etc.) es genética y estructuralmente distinta (véase la Apli. Clín. 3.6). La masa molecular de las apolipoproteínas varía desde 6 kDa (apoC-I) hasta 550 kDa para la apoB-100. Esta última proteína es uno de los polipéptidos de cadena única más largos que se conocen (4536 aminoácidos).

En la Figura 3.43 se muestra un modelo de una partícula de VLDL. En el interior hay lípidos neutros tales como ésteres de colesterol y triacilgliceroles. Alrededor de este núcleo interno de lípidos neutros, formando una cubierta de ~20 Å de grosor, se encuentran las proteínas y los lípidos anfotéricos cargados tales como el colesterol no esterificado y las fosfatidilcolinas (véase p. 729). Los lípidos anfotéricos y las proteínas de la cubierta externa dirigen sus regiones apolares hidrofóbicas hacia el interior de la partícula y sus grupos cargados hacia el exterior, donde interaccionan entre sí y con el agua. Este modelo esférico, con un núcleo interno



APLICACIÓN CLÍNICA 3.6
Hipolipoproteinemias

La abetalipoproteinemia es una enfermedad transmitida genéticamente que se caracteriza por la ausencia de quilomicrones, VLDL y LDL, debido a la incapacidad de sintetizar apolipoproteína B-100. Los pacientes presentan acumulación de gotitas de lípidos en las células del intestino delgado, mala absorción de grasas, acantocitosis (glóbulos rojos en forma de espina) y enfermedad neurológica (retinitis pigmentosa, ataxia y retraso).

La enfermedad de Tangier, una deficiencia de α-lipoproteína, es una enfermedad poco frecuente de tipo autosómico recesivo en la que el nivel de HDL es un 1-5% de su valor normal. Las manifestaciones clínicas se deben a la acumulación de colesterol en el sistema linforreticular, que puede dar lugar a hepatomegalia y esplenomegalia. En esta enfermedad el colesterol y los fosfolípidos plasmáticos están muy reducidos.

El déficit de lecitina:colesterol aciltransferasa es una enfermedad infrecuente que induce la producción de lipoproteína X (véase la Apli. Clín. 3.5). También es característico de esta enfermedad el descenso de las bandas de α-lipoproteína y de pre-β-lipoproteína, y el aumento de la β-lipoproteína (lipoproteína X) en las electroforesis.

Kane, J. P. y Havel, R. J. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the β apolipoproteins. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, Cap.57; y Assmann, G., von Eckardstein, A. y Brewer, H. B. Jr. Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier disease. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, Cap. 64.

TABLA 3.13 Apolipoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas humanas. (Valores en porcentaje de la proteína total presente.)[a]

Apolipoproteína	*HDL_2*	*HDL_3*	*LDL*	*IDL*	*VLDL*	*Quilomicrones*
ApoA-I	85	70–75	Trazas	0	0–3	0–3
ApoA-II	5	20	Trazas	0	0–0,5	0–1,5
ApoD	0	1–2			0	1
ApoB	0–2	0	95–100	50–60	40–50	20–22
ApoC-I	1–2	1–2	0–5	<1	5	5–10
ApoC-II	1	1	0,5	2,5	10	15
ApoC-III	2–3	2–3	0–5	17	20–25	40
ApoE	Trazas	0–5	0	15–20	5–10	5
ApoF	Trazas	Trazas				
ApoG	Trazas	Trazas				

Datos de Soutar, A. K y Myant, N. B. En: R. E. Offord (Ed.), *Chemistry of Macromolecules,* IIB. Baltimore, MD: University Park Press, 1979; Kostner, G. M. *Adv. Lipid Res.* 20:1, 1983.

[a] Los valores muestran variabilidad según los diferentes laboratorios.

hidrofóbico de lípidos neutros y las proteínas y los lípidos anfotéricos en la cubierta externa, es válido para todas las lipoproteínas plasmáticas. A medida que el diámetro de la partícula disminuye, las moléculas de la cubierta externa representan un porcentaje mayor del total de las moléculas presentes en la partícula. Por consiguiente, puede predecirse teóricamente que las partículas de HDL más pequeñas tengan un porcentaje de proteína y lípidos anfotéricos de superficie mayor que las partículas de VLDL más grandes. De hecho, las partículas de HDL están compuestas por un 45% de proteína y un 55% de lípido, mientras que las VLDL más grandes contiene sólo un 10% de proteína y un 90% de lípido (Tabla 3.14).

Las apolipoproteínas, a excepción de la apoB, tienen un elevado contenido de hélice α cuando están asociadas con lípidos. Las regiones helicoidales tienen propiedades anfipáticas. Cada tercer o cuarto aminoácido de la hélice está cargado y forma un borde polar que se asocia con las cabezas polares de los fosfolípidos y con el medio acuoso. El otro lado de la hélice contiene cadenas laterales hidrófobicas que se asocian con el núcleo de lípidos neutros apolares de la partícula lipoproteica. En la Figura 3.44 se muestra la estructura en hélice α de una parte de la apoC- I. La apoB contiene regiones de hélice α y de estructura β alojadas en la parte externa del núcleo lipídico. La cadena polipeptídica de 4536 residuos de la apoB-100 rodea la circunferencia de la partícula de LDL como un cinturón que zigzaguea hacia dentro y hacia afuera dentro de la monocapa de fosfolípido de la cubierta externa (Figura 3.43). Cada partícula de LDL contiene una sola molécula de apoB.

Las glucoproteínas contienen glúcidos unidos covalentemente

Las **glucoproteínas** participan en muchas funciones normales y en otras relacionadas con enfermedades de importancia clínica. Muchas proteínas de la membrana plasmática son glucoproteínas. Algunas son antígenos, como los que determinan el

TABLA 3.14 Composición química de las diferentes clases de lipoproteínas plasmáticas

Clase de lipoproteína	*Proteína total (%)*	*Lípido total (%)*	*Composición porcentual de la fracción lipídica*			
			Fosfolípidos	*Colesterol esterificado*	*Colesterol sin esterificar*	*Triacilgliceroles*
HDL_2[a]	40–45	55	35	12	4	5
HDL_3[a]	50–55	50	20–25	12	3–4	3
LDL	20–25	75–80	15–20	35–40	7–10	7–10
IDL	15–20	80–85	22	22	8	30
VLDL	5–10	90–95	15–20	10–15	5–10	50–65
Quilomicrones	1,5–2,5	97–99	7–9	3–5	1–3	84–89

Datos de Soutar, A. K. y Myant, N. B. En: R. E. Offord (Ed.), *Chemistry of Macromolecules,* IIB. Baltimore, MD: University Park Press, 1979.

[a] Subclases de HDL.

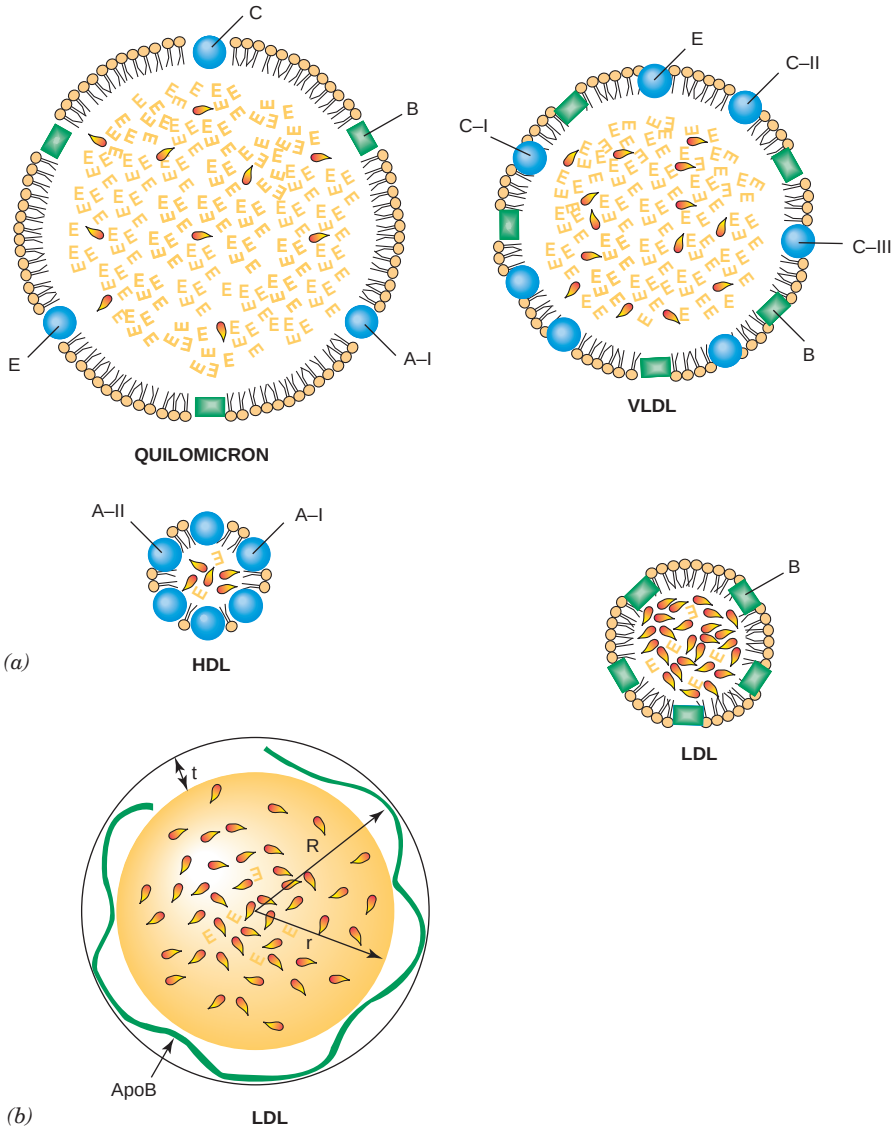


FIGURA 3.43
Estructura general de las lipoproteínas plasmáticas.
(*a*) La partícula esférica consta de un núcleo de triacilgliceroles ("E" en amarillo) y ésteres de colesterol ("gotas" en anaranjado) con una cubierta de ~20 Å de grosor, compuesta de apolipoproteínas (indicadas con letras), fosfolípidos y colesterol no esterificado. Las apolipoproteínas están incluidas con sus extremos hidrófobicos orientados hacia el interior y sus extremos hidrofílicos hacia el exterior.
(*b*) Partícula de LDL que muestra la ApoB-100 incluida en la cubierta exterior de la partícula. *Parte (a) de Segrest, J. P., et al.* Adv. Protein Chem. *45:303, 1994; Parte (b) de Schumaker, V. N., et al.* Protein Chem. *45:205, 1994.*

sistema de antígenos sanguíneos (A, B, 0) y los determinantes de histocompatibilidad y de transplante de un individuo. Los sitios antigénicos de las inmunoglobulinas, y los receptores de hormonas y virus de las membranas plasmáticas son a menudo glucoproteínas. Las glúcidos de las membranas sirven de código de superficie para la identificación por otras células y para la inhibición por contacto en la regulación del crecimiento celular. Los cambios en las glucoproteínas de membrana se han relacionado con la génesis tumoral y la transformación maligna en el cáncer. La mayoría de las proteínas plasmáticas, con excepción de la albúmina, son glucoproteínas; entre ellas las proteínas de la coagulación de la sangre, las inmunoglobulinas y muchas de las proteínas del complemento. Algunas hormonas proteicas, como la hormona estimuladora del folículo (FSH) y la hormona estimuladora del tiroides (TSH), son glucoproteínas. Las proteínas estructurales colágeno, laminina y

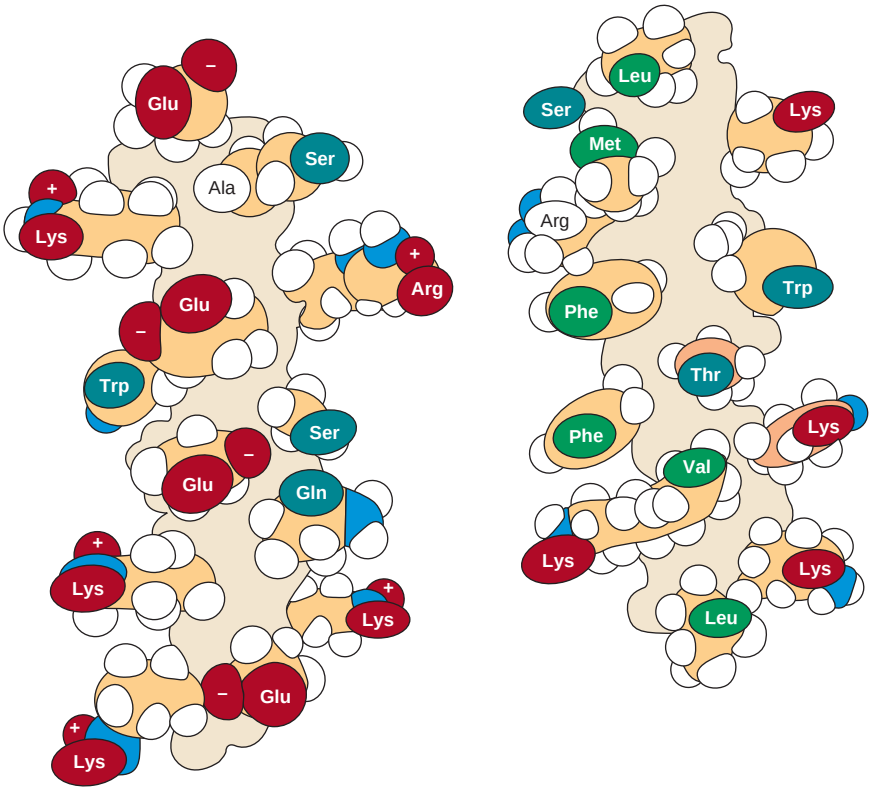


FIGURA 3.44
Ilustración que muestra las cadenas laterales de un segmento helicoidal de la apolipoproteína C-1 entre los residuos 32 y 53.
En la cara polar se observan residuos ionizables ácidos en el centro y residuos básicos en el borde. En el otro lado de la hélice, los residuos hidrofóbicos forman una cara longitudinal apolar.
Reproducido con autorización de Sparrow, J. T. and Gotto, A. M. Jr. CRC Crit. Rev. Biochem. *13:87, 1983. Copyright © 1983 CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.*

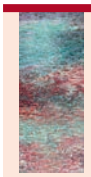
fibronectina contienen glúcidos, al igual que las proteínas de las secreciones mucosas que tienen un papel en la lubricación y protección del tejido epitelial.

El porcentaje de glúcidos de las glucoproteínas es variable. Las IgG contienen pequeñas cantidades de glúcido (4%), mientras que la glicoforina de la membrana celular de los eritrocitos humanos contiene un 60% de glúcido y la glucoproteína gástrica humana un 82%. El glúcido puede distribuirse uniformemente a lo largo de la cadena polipeptídica o concentrarse en regiones definidas. En las proteínas de la membrana plasmática sólo la porción extracelular tiene glúcidos unidos covalentemente. El glúcido unido a uno o a múltiples puntos de la cadena polipeptídica contiene normalmente menos de 15 residuos de azúcar y en algunos casos uno solo. Las glucoproteínas con idéntica función procedentes de diferentes especies animales presentan a menudo secuencias de aminoácidos homólogas pero estructuras glucídicas variables. La heterogeneidad en el contenido de glúcidos puede llegar a darse en la misma proteína en un mismo organismo. Por ejemplo, las formas A y B de la ribonucleasa pancreática tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero difieren en su composición glucídica.

La adición de unidades glucídicas complejas tiene lugar en una serie de reacciones catalizadas por enzimas a medida que la cadena polipeptídica es transportada a través del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi (véase el Capítulo 6). Las glucoproteínas inmaduras no funcionales a veces presentan estados intermedios de glucosilación.

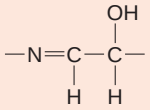
Tipos de enlaces covalentes glúcido–proteína

Las porciones glucídica y proteica de una glucoproteína se unen mediante diferentes tipos de enlaces covalentes. Los dos más comunes son el **enlaces *N*-glucosídico**

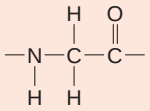


APLICACIÓN CLÍNICA 3.7
Hemoglobina glucosilada, HbA_{1c}

Una hemoglobina glucosilada, denominada HbA_{1c} se forma espontáneamente en los glóbulos rojos por reacción de los grupos terminales $-NH_2$ de la cadena β de la hemoglobina con la glucosa. La función aldehído de la glucosa forma primero una base de Schiff con el grupo NH_2-terminal,



que a continuación se reordena formando un enlace amino cetona más estable,



mediante una reacción espontánea (no enzimática) conocida como reordenamiento de Amadori. La concentración de HbA_{1c} depende de la concentración de glucosa en sangre y de la duración del estado hiperglucémico. En las hiperglucemias prolongadas puede aumentar hasta un 12% o más de la hemoglobina total. Los pacientes con diabetes mellitus tienen una alta concentración de glucosa sanguínea, y, por tanto, elevadas cantidades de HbA_{1c}. Los cambios de la concentración de HbA_{1c} en los pacientes diabéticos se pueden utilizar para seguir la eficacia del tratamiento de la diabetes.

Bunn, H. F. Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients. *Diabetes* 30:613, 1980; y Brown, S. B. y Bowes, M. A. Glycosylated haemoglobins and their role in management of diabetes mellitus. *Biochem. Educ.* 13:2, 1985.

(enlace de tipo I) formado entre un grupo amida de una asparagina y un glúcido, y el **enlace *O*-glucosídico** (enlace de tipo II) entre el grupo hidroxilo de una serina o treonina y un glúcido (Figura 3.45). En la unión de tipo I, el enlace con la asparagina se encuentra en la secuencia Asn-X-Thr(Ser). Otro enlace presente en glucoproteínas de mamíferos es el *O*-glucosídico con 5-hidroxilisina (enlace de tipo III), que se encuentra en colágenos y en la proteína del complemento C1q. Otros enlaces menos comunes incluyen la unión al grupo hidroxilo de la 4-hidroxiprolina (enlace de tipo IV), al tiol de la cadena lateral de cisteína (enlace de tipo V), y al NH_2 del grupo α-amino NH_2-terminal de una cadena polipeptídica (enlace de tipo VI). En los diabéticos no controlados se forman espontáneamente altas concentraciones de enlaces de tipo VI entre la hemoglobina y la glucosa de la sangre. Los análisis de la concentración de hemoglobina glucosilada se utilizan para seguir los cambios de la concentración de glucosa en sangre (véase la Apli. Clín. 3.7).

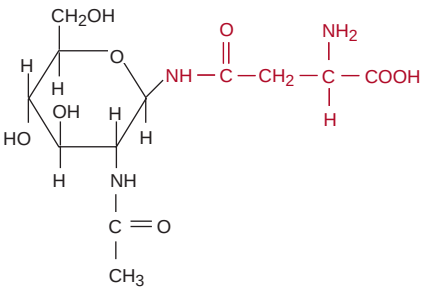
3.7 PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS EN ESTRUCTURAS ÚNICAS A PARTIR DE ESTRUCTURAS ESTADÍSTICAS: ESTABILIDAD PROTEICA

El problema del plegamiento de las proteínas: una posible ruta

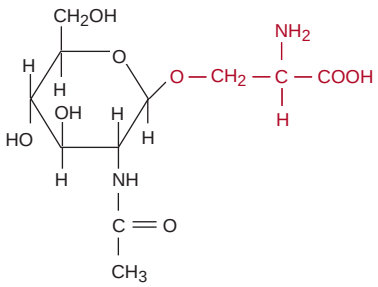
Se ha demostrado la capacidad de la estructura primaria de una proteína para plegarse espontáneamente en su conformación secundaria o terciaria nativas, sin otra información que la secuencia de aminoácidos y las fuerzas no covalentes que actúan sobre la secuencia. La RNAasa se repliega espontáneamente en su conformación nativa tras haber sido desnaturalizada, con pérdida de su estructura nativa, pero sin hidrólisis de los enlaces peptídicos. Este tipo de observaciones condujeron a la hipótesis de que la secuencia polipeptídica es capaz de plegarse espontáneamente en su conformación activa única, siempre que las condiciones de disolución sean correctas y en presencia de los grupos prostéticos que puedan formar parte de la estructura. Como se describe más adelante, las proteínas chaperonas pueden aumentar la velocidad de plegamiento de las proteínas. Las estructuras cuaternarias también se forman espontáneamente, una vez que se ha formado la estructura terciaria de las subunidades.

Puede parecer sorprendente que una proteína se pliegue en una única conformación, dadas las múltiples posibles conformaciones rotacionales disponibles alrededor de los enlaces sencillos de la estructura primaria. Por ejemplo, la cadena α de la hemoglobina contiene 141 aminoácidos, y hay al menos 4 enlaces sencillos por residuo aminoácido alrededor de los cuales puede tener lugar una rotación libre. Si cada uno de estos enlaces puede tener dos o más rotámeros estables, hay un mínimo de 4^{141} o 5×10^{86} conformaciones posibles para la secuencia de aminoácidos de la cadena α.

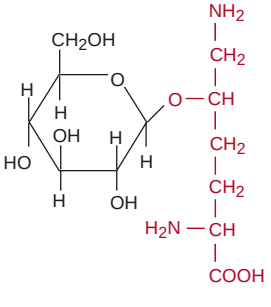
La conformación de una proteína es la conformación de más baja energía libre de Gibbs que puede lograr la secuencia de aminoácidos en un intervalo fisiológico de tiempo. Así, el proceso de plegamiento se encuentra bajo control termodinámico



Tipo I Enlace *N*-glucosídico con asparagina



Tipo II Enlace *O*-glucosídico con serina



Tipo III Enlace *O*-glucosídico con 5-hidroxilisina

FIGURA 3.45
Ejemplos de enlaces glucosídicos con aminoácidos en las proteínas.
El tipo I es un enlace *N*-glucosídico por medio de un nitrógeno amídico de la Asn; el tipo II es un enlace *O*-glucosídico a través del OH de la Ser o la Thr; y el tipo III es un enlace *O*-glucosídico con el 5-OH de la 5-hidroxilisina. Los aminoácidos se representan en rojo y los azúcares en negro.

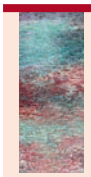
y cinético. Aunque el conocimiento exacto del proceso de plegamiento *de novo* de un polipéptido es actualmente un objetivo inalcanzable, se acepta la participación de determinados procesos. Existen pruebas de que el plegamiento se inicia por interacciones no covalentes de corto alcance entre una cadena lateral y las cadenas vecinas más próximas que forman estructuras secundarias en pequeñas regiones del polipéptido. Determinadas cadenas laterales tienen tendencia a formar hélices α, estructuras β y giros cerrados (giros β) en el polipéptido. La interacción de una cadena lateral con sus vecinas más próximas en el polipéptido determina la estructura secundaria en la cual el fragmento de cadena polipeptídica se va a plegar. Así, fragmentos de cadena polipeptídica, denominados **sitios de iniciación**, se pliegan espontáneamente, formando pequeñas regiones de estructura secundaria. A continuación, las estructuras parcialmente plegadas se condensan con otras para formar el estado de **glóbulo fundido**. Este es un intermediario condensado de la ruta de plegamiento que contiene muchos de los elementos de estructura secundaria de la estructura nativa, pero también un gran número de interacciones terciarias incorrectas. Los segmentos de estructura secundaria en el estado de glóbulo fundido son muy móviles unos con respecto a otros, y la estructura globular fundida se encuentra en rápido equilibrio con el estado desnaturalizado totalmente desplegado. Las interacciones correctas de medio y largo alcance entre diferentes sitios de iniciación se establecen por reordenaciones dentro del glóbulo fundido, hasta que acaba formándose la estructura terciaria nativa, de baja energía libre, de la cadena polipeptídica. Una vez formada la estructura terciaria nativa, se establecen los puentes disulfuro (cistina) correctos. La etapa que determina la velocidad de plegamiento y desplegamiento de la conformación nativa se encuentra entre el estado globular fundido y la estructura nativa. Para algunas proteínas puede haber dos o más conformaciones plegadas de baja energía de Gibbs termodinámicamente estables.

En la Apli. Clín. 3.8 se trata el plegamiento de las proteínas y los priones como agentes infecciosos.

Las proteínas chaperona pueden favorecer el proceso de plegamiento de las proteínas

Las células contienen proteínas que favorecen el proceso de plegamiento. Estas proteínas incluyen *cis-trans* prolil isomerasas, disulfuro isomerasas y chaperonas. Las ***cis-trans* prolil isomerasas** incrementan la velocidad del plegamiento catalizando la interconversión de enlaces peptídicos en *cis* y *trans* de los residuos de prolina. Esto permite que el enlace peptídico de cada prolina adopte la conformación correcta, de acuerdo con los requerimientos de la estructura nativa plegada. Las **disulfuro isomerasas** catalizan la rotura y formación de puentes disulfuro de cistina, de modo que los enlaces incorrectos no se estabilizan, mientras que los adecuados para la conformación plegada se forman rápidamente.

Las **chaperonas** se descubrieron como **proteínas de choque térmico (hsp)**, una familia de proteínas cuya síntesis aumenta a elevadas temperaturas. Las chaperonas no alteran el resultado final del proceso de plegamiento, pero evitan la agregación de las proteínas antes de la finalización del plegamiento y la formación de intermediarios metaestables no productivos o sin salida. Las chaperonas aumentan la velocidad del proceso de plegamiento disminuyendo el número de las rutas de plegamiento no productivas disponibles para un polipéptido. Las chaperonas de la familia hsp de 70 kDa se unen a los polipéptidos a medida que son sintetizados en los ribosomas, protegiendo las superficies hidrofóbicas que normalmente estarían expuestas al disolvente. Con ello evitan la agregación de la proteína antes de que la síntesis haya finalizado y pueda producirse el plegamiento. Sin embargo, algunas proteínas no pueden finalizar su proceso de plegamiento en presencia de chaperonas hsp70, proceso que corre a cargo de la familia hsp60 (GroEL en *Escherichia coli*) de chaperonas, también denominadas **chaperoninas**. Las chaperoninas forman largas estructuras cuaternarias cilíndricas compuestas por múltiples subunidades, en cuya cavidad central hidrofóbica se unen las proteínas en estado de glóbulo fundido. Las chaperoninas poseen actividad ATPasa e hidrolizan ATP a medida que facilitan el plegamiento. En la Figura 3.46 se presenta el proceso de plegamiento en *E. coli*. Las chaperonas también son necesarias para el plegamiento de las proteínas después de que éstas hayan atravesado la membrana celular. Hay un sistema de chaperonas que facilita el transporte de proteínas al interior de la mitocondria y a través de las membranas del retículo endoplasmático. Las proteínas cruzan la bicapa



APLICACIÓN CLÍNICA 3.8

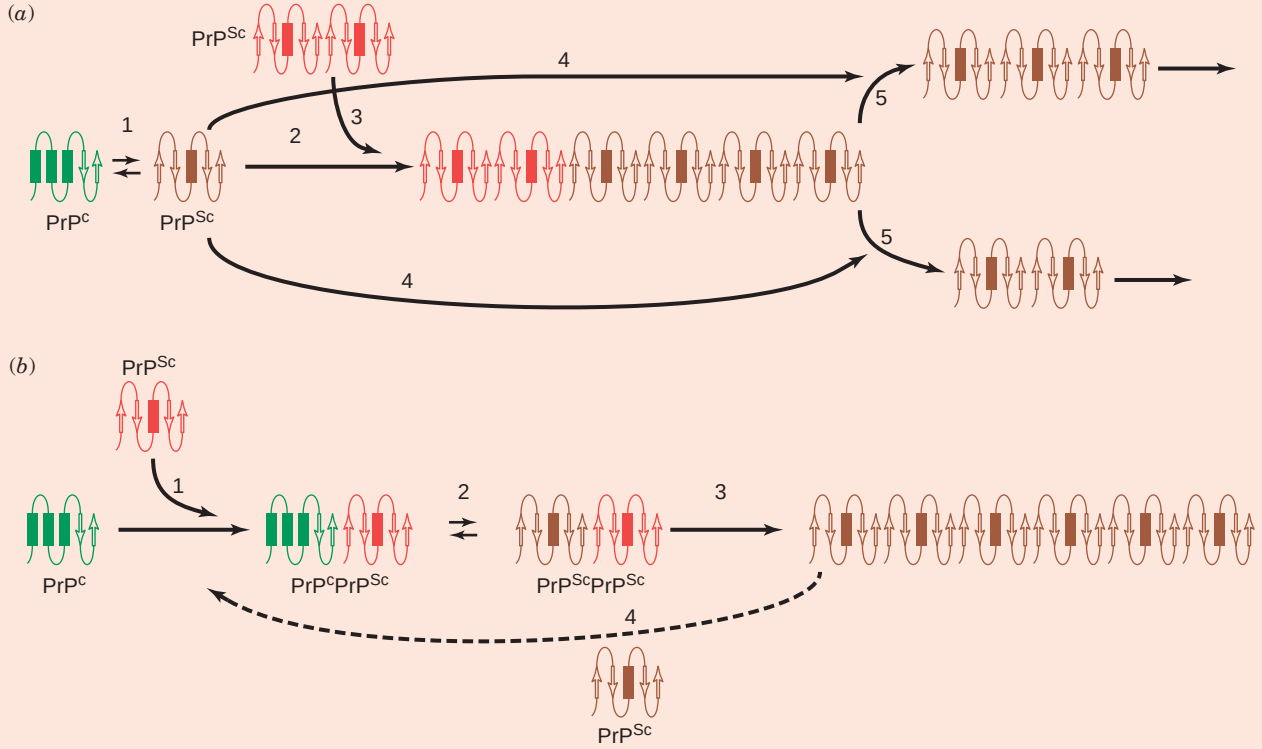
Las proteínas como agentes infecciosos: Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE) humanas

Las proteínas que actúan como agentes infecciosos en ausencia de DNA o RNA se conocen como priones. La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) es la enfermedad más común causada por priones. Se caracteriza por ataxia, demencia y parálisis, y es casi siempre fatal. El examen patológico del cerebro muestra placas amiloides y degeneración espongiforme (vacuolas). La enfermedad puede ser causada por una mutación heredada (enfermedad familiar), una mutación espontánea o un proceso infeccioso. La forma infecciosa se observó por primera vez en los nativos de Nueva Guinea, que manifestaban una encefalopatía espongiforme transmisible denominada Kuru, en la cual los priones se transmitían a través de la práctica del canibalismo ritual. Recientemente, la encefalopatía espongiforme bovina o mal de las vacas locas se transmitió a los seres humanos por ingestión de carne de ganado infectado por la encefalopatía espongiforme bovina. Aunque existen pruebas muy convincentes de que el agente infeccioso es una proteína, aún no se ha demostrado la infección directa de un animal con el prión recombinante puro.

Se cree que la enfermedad está causada por un cambio conformacional de la proteína priónica, PrP, que modificaría la conformación de la forma soluble celular normal, PrP^{c}, para dar la conformación tóxica, PrP^{Sc}, que polimeriza en fibras amiloides insolubles que causan las patologías neurales. El plegamiento de la PrP^{c} soluble consiste en tres segmentos en hélice α y dos pequeños segmentos en conformación β. La transformación en la forma PrP^{Sc} se caracteriza por la conversión de dos de los segmentos α helicoidales en conformaciones de hoja β. La conformación PrP^{Sc} polimeriza en fibras amiloides mediante interacciones entre los segmentos con estructura β de los monómeros. La formación de los polímeros amiloides es irreversible. Un factor desconocido, denominado proteína X (tal vez una chaperona), facilita la conversión de la hélice α en estructura β y/o promueve la polimerización de la conformación en estructura β, que forma la fibra amiloide. Se han sugerido dos mecanismos para explicar la formación de la placa amiloide, iniciada por una proteína priónica infecciosa. En el mecanismo de nucleación-polimerización (a), la conformación PrP^{c} (verde) se encuentra en rápido equilibrio con la conformación PrP^{Sc} (marrón) (paso 1), pero la polimerización de la fibra amiloide (paso 2) es lenta en ausencia de una molécula iniciadora. La adición de proteína en la conformación PrP^{Sc} o de un fragmento (prión infectivo, rojo) induce el proceso de polimerización (paso 3). El proceso se propaga mediante fragmentos del polímero recién formado (paso 5).

En el mecanismo dirigido por molde (b), el prión infeccioso, PrP^{Sc}, sirve de molde para inducir el cambio conformacional del PrP^{c} endógeno a PrP^{Sc} (pasos 1 y 2). Una vez que se produce la conversión, las conformaciones PrP^{Sc} polimerizan rápidamente formando fibras insolubles. Las formas familiares de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob son causadas por proteínas PrP mutantes que tienen una mayor tendencia a adquirir espontáneamente la conformación PrP^{Sc}.

Horwich, A. L. y Weissman, J. S. Deadly conformations—protein misfolding in prion disease. *Cell* 89:499, 1997; y Prusiner, S. B. Prion diseases and the BSE crises. *Science* 278:245, 1997.



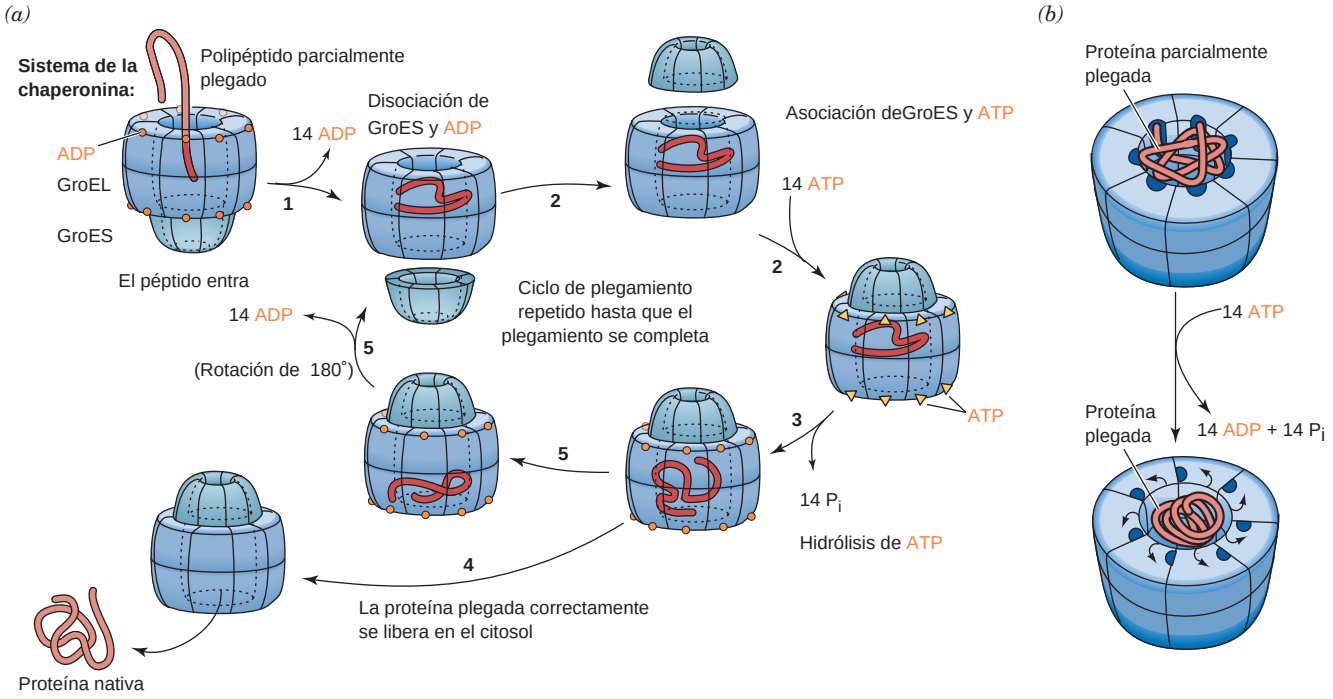


FIGURA 3.46
Plegamiento de proteínas dirigido por chaperoninas en *E. coli*.
(*a*) Ciclo de reacción propuesto para las chaperoninas GroEL y Gro ES de *E. coli* en el plegamiento de proteínas. (1) GroEL es un complejo de 14 subunidades con ADP unido a cada una de ellas. Un polipéptido desplegado se une a la cavidad central de un anillo compuesto por 7 subunidades de GroES, liberándose el ADP y las subunidades de GroES. (2) Cada subunidad de GroEL fija una molécula de ATP, lo cual debilita la interacción entre el polipéptido desplegado y GroEL. GroES se vuelve a unir a GroEL en la cara opuesta del complejo. (3) Las 14 moléculas de ATP se hidrolizan simultáneamente, liberando el polipéptido en el interior de GroEL. El polipéptido, que se encuentra en un estado de glóbulo fundido, se pliega en un microentorno protegido, evitando así la agregación con otros polipéptidos parcialmente plegados. (4) Después de plegarse en su conformación nativa, el polipéptido se libera de GroEL. (5) Si el polipéptido no consigue alcanzar su conformación nativa, permanece unido a GroEL y vuelve a entrar en el ciclo de reacción en el paso 2. En el esquema, GroEL da un giro de 180 °C. GroES fija pero no hidroliza ATP, favoreciendo así la unión del ATP a GroEL. GroEs coordina simultáneamente la hidrólisis del ATP y evita que polipéptidos parcialmente plegados se escapen de la cavidad formada por GroEL. (*b*) Modelo de la liberación dependiente de ATP de un polipéptido desplegado de sus múltiples sitios de fijación en GroEL. La fijación e hidrólisis de ATP enmascaran los sitios hidrofóbicos de GroEL (áreas oscuras) que se unen al polipéptido desplegado, permitiendo así su plegamiento en un entorno aislado.
Adaptado de Hartl, R.-U., Hlodan, R. y Langer, T. Trends Biochem. Sci. *19: 23, 1994. Figura reproduceida de Voet, D. y Voet, J.* Biochemistry, *2nd ed. New York: Wiley, 1995. Reproducida con autorización de John Wiley & Sons, Inc.*

lipídica de las membranas mitocondriales y del retículo endoplasmático en una conformación desplegada y las chaperonas locales facilitan su plegamiento.

Las fuerzas no covalentes provocan el plegamiento de las proteínas y contribuyen a su estabilidad

Las fuerzas no covalentes hacen que los polipéptidos se plieguen en conformaciones únicas y estabilizan las estructuras nativas frente a la desnaturalización. Las fuerzas no covalentes son fuerzas de unión débiles, con energías de enlace de 1 a 7 kcal mol^{-1} (4 a 29 kJ mol^{-1}); puede compararse este valor con el de la fuerza de los enlaces covalentes, que es de al menos 50 kcal mol^{-1} (Tabla 3.15). Si bien son individualmente débiles, el gran número de contactos no covalentes existentes en una proteína resulta en una gran contribución energética que favorece el plegamiento de la proteína.

Fuerzas de interacción hidrofóbica

Las fuerzas no covalentes más importantes que hacen que una conformación polipeptídica al azar se pliegue en su estructura nativa son las **fuerzas de interacción hidrofóbica**. Su fuerza no es consecuencia de una atracción intrínseca entre grupos no polares, sino más bien de las propiedades del agua que rodea los grupos no polares. Una molécula no polar o una región de una molécula de proteína disuelta en agua induce la formación de una capa de solvatación, en la cual las moléculas de

TABLA 3.15 Energía de enlaces típicos de las estructuras proteicas

Tipo de enlace	*Energía de enlace (kcal mol^{-1})*
Enlaces covalentes	>50
Enlaces no covalentes	0,6–7
Enlace hidrofóbico (p. ej., 2 bencilos de las cadenas laterales de Phe)	2–3
Puente de hidrógeno	1–7
Enlace iónico (entorno de baja constante dieléctrica)	1–6
van der Waals	<1
Energía media del movimiento cinético (37 °C)	0,6

agua están altamente ordenadas. Cuando dos cadenas laterales no polares se ponen en contacto durante el plegamiento de un polipéptido, el área de la superficie expuesta al disolvente se reduce, y una parte del agua altamente ordenada de la capa de solvatación se libera en el grueso del disolvente. La entropía del sistema (es decir, el desorden neto de las moléculas de agua del sistema) aumenta. El aumento de entropía es un proceso termodinámicamente favorable, y es la fuerza motriz que hace que grupos apolares se junten en un disolvente acuoso. Un cambio favorable de energía libre de -2 kcal mol^{-1} en la asociación de los grupos de la cadena lateral de dos fenilalaninas en agua se debe a esta ganancia de entropía (Figura 3.47).

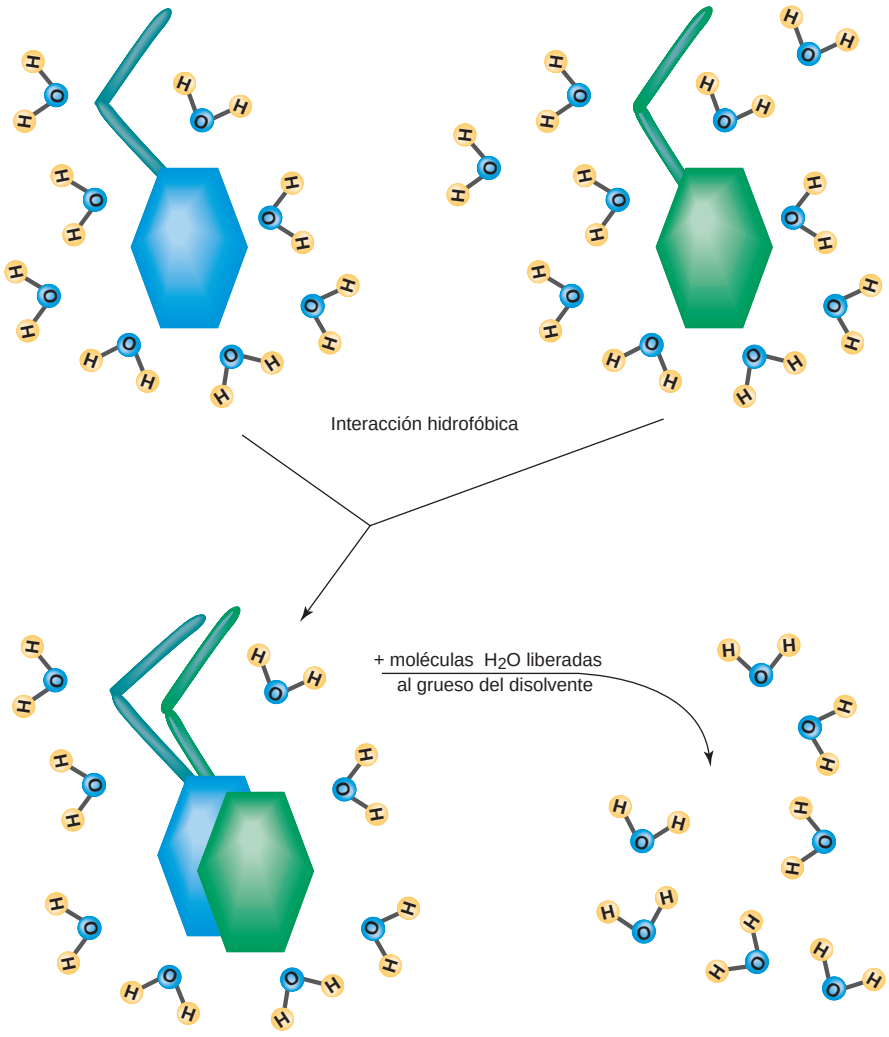


FIGURA 3.47
Formación de interacciones hidrofóbicas entre los grupos de las cadenas laterales de dos fenilalaninas.

En la transición desde una conformación estadística a una conformación secundaria regular, tal como una hélice α o una estructura β, se libera aproximadamente un tercio del agua de solvatación que rodea el polipéptido desplegado. Ello equivale a 0,5–0,9 kcal mol^{-1} por residuo peptídico. Otro tercio de la capa de solvatación original se pierde cuando una polipéptido con estructura secundaria adquiere estructura terciaria. El plegamiento terciario pone diferentes segmentos de cadenas polipeptídicas plegadas en estrecho contacto, con liberación de agua de solvatación entre las cadenas polipeptídicas.

Puentes de hidrógeno

Los **puentes de hidrógeno** se forman cuando un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un átomo electronegativo se comparte con un segundo átomo electronegativo. El átomo al que está unido covalentemente el átomo de hidrógeno se designa como **átomo dador de hidrógeno**. El átomo con el cual se comparte el átomo de hidrógeno es el **átomo aceptor de hidrógeno**. En la Figura 3.48 se muestran puentes de hidrógeno típicos presentes en las proteínas. Las conformaciones en hélice α y estructura β contienen gran cantidad de puentes de hidrógeno.

La fuerza de un puente de hidrógeno depende de la distancia que existe entre los átomos dador y aceptor. Cuando la distancia entre los átomos dador y aceptor se encuentra entre 2,7 y 3,1 Å, las energías de enlace son altas. La fuerza de los puentes de hidrógeno también depende en menor medida, aunque no es despreciable, de la geometría. Los puentes de más alta energía son geométricamente colineales, con el dador, el hidrógeno y el aceptor en línea recta. La constante dieléctrica del medio que rodea el puente de hidrógeno también puede influir en la fuerza del enlace. Las fuerzas de los enlaces de hidrógeno típicos de las proteínas están entre 1–7 kcal mol^{-1}. Aunque los puentes de hidrógeno contribuyen a la estabilidad termodinámica de la conformación plegada de la proteína, su formación posiblemente no sea una de las principales fuerzas motrices para el plegamiento. Ello se debe a que los enlaces peptídicos y otros grupos formadores de puentes de hidrógeno en las proteínas forman en el estado desnaturalizado puentes de hidrógeno con el disolvente acuoso, y estos puentes deben romperse antes de que el polipéptido se pliegue. Para calcular la contribución neta de la fuerza de los puentes de hidrógeno en el plegamiento, la energía requerida para romper los enlaces de hidrógeno con el agua se debe restar de la ganancia de energía asociada con la formación de nuevos enlaces de hidrógeno entre los átomos de la proteína plegada.

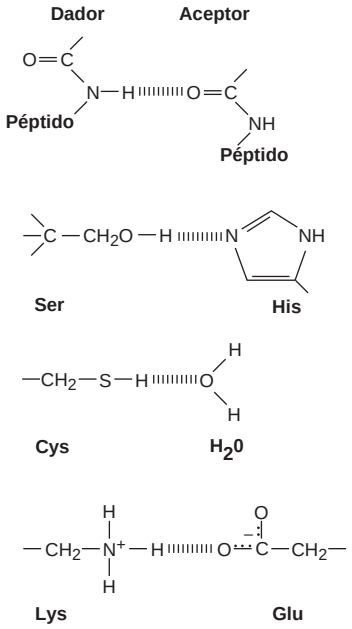


FIGURA 3.48
Algunos puentes de hidrógeno comunes en las proteínas.

Interacciones electrostáticas

Las **interacciones electrostáticas** (también denominadas **enlaces iónicos** o **salinos**) entre grupos cargados son importantes en la estabilización de la estructura proteica y para la fijación de ligandos y sustratos cargados a las proteínas. Las fuerzas electrostáticas son repulsivas o atractivas, dependiendo de si las cargas que interaccionan son de igual o distinto signo. La intensidad de una fuerza electrostática (E_{el}) depende directamente de la carga (Z) de cada ion, y es inversamente proporcional a la constante dieléctrica (D) del disolvente y a la distancia entre las cargas (r_{ab}) (Figura 3.49).

El agua tiene una constante dieléctrica elevada ($D = 80$), por lo que las interacciones en agua son relativamente débiles en comparación con las interacciones electrostáticas en el interior de una proteína, donde la constante dieléctrica es baja. Sin embargo, la mayoría de los grupos cargados de las proteínas se hallan en la superficie, donde no interaccionan fuertemente con otros grupos cargados de la proteína debido a la alta constante dieléctrica del agua, pero están estabilizados mediante puentes de hidrógeno e interacciones polares con el agua. Las interacciones con el agua son las principales fuerzas que justifican la colocación de la mayoría de los grupos cargados de una proteína en el exterior de las estructuras plegadas.

$$E_{el} \approx \frac{Z_A \cdot Z_B \cdot \varepsilon^2}{D \cdot r_{ab}}$$

FIGURA 3.49
Fuerza de las interacciones electrostáticas.

Fuerzas de dispersión de van der Waals–London

Las **fuerzas de dispersión de van der Waals** y **de London** son las fuerzas no covalentes más débiles. Estas fuerzas tiene un término atractivo (A) inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los dos átomos que interaccionan (r_{ab}), y un término repulsivo (B) inversamente proporcional a la 12ª potencia de r_{ab} (Figura 3.50). El término A contribuye, a la distancia óptima, con una fuerza atractiva inferior a 1 kcal mol^{-1} por interacción atómica. Este componente atractivo se debe a la inducción de cargas parciales complementarias o dipolos en la densidad electrónica de átomos adyacentes cuando los orbitales electrónicos de los dos áto-

$$E_{VDW} = -\frac{A}{r_{ab}^{6}} + \frac{B}{r_{ab}^{12}}$$

FIGURA 3.50
Fuerza de las interacciones de van der Waals.

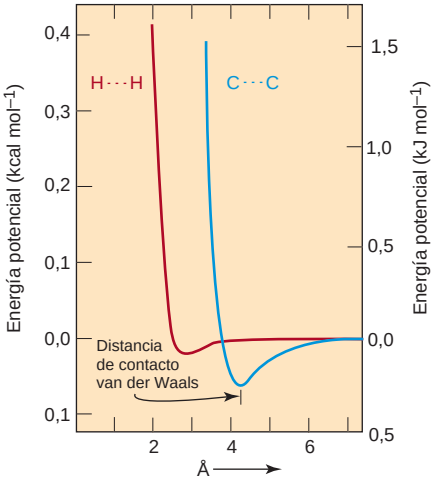


FIGURA 3.51
Energías de dispersión de van der Waals–London entre dos átomos de hidrógeno y dos átomos de carbono (tetraédricos).
Las energías negativas son favorables y las positivas desfavorables.
Reproducido de Fersht, A. Enzyme Structure and Mechanism. *San Francisco: Freeman, 1977, p. 228.*

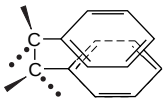


FIGURA 3.52
Interacciones electrón-π–electrón-π entre dos anillos aromáticos.

mos se aproximan. Sin embargo, el componente repulsivo (B) de la fuerza de van der Waals predomina cuando los orbitales electrónicos de los átomos adyacentes empiezan a solaparse a medida que se van acercando. La fuerza repulsiva se conoce comúnmente como **impedimento estérico**.

La distancia de interacción más favorable entre dos átomos es la **distancia de contacto de van der Waals**, y es igual a la suma de los radios de van der Waals de los dos átomos (Figura 3.51). En la Tabla 3.16 se indican los radios de van der Waals de átomos que se encuentran en las proteínas.

Las fuerzas de van der Waals repulsivas entre los átomos de un enlace peptídico son más débiles en los ángulos ϕ y ψ específicos compatibles con las estructuras en hélice α y cadena β. Por consiguiente, las fuerzas de van der Waals son extremadamente importantes para la formación de la estructura secundaria de las proteínas. En el plegamiento a estructura terciaria se producen miles de interacciones de van der Waals débiles. La contribución total de las fuerzas de dispersión de van der Waals–London a la estabilidad de una estructura plegada es, pues, considerable, aunque la interacción entre dos átomos cualesquiera sea inferior a 1 kcal mol^{-1}.

Un tipo especial de interacción (electrón π–electrón π) tiene lugar cuando se acercan dos anillos aromáticos y los electrones de estos anillos interaccionan favorablemente (Figura 3.52). Esta interacción puede dar lugar a una fuerza atractiva de hasta 6 kcal mol^{-1}. En una proteína plegada típica hay un número significativo de interacciones aromáticas π–π, que contribuyen a la estabilidad de la estructura plegada.

La desnaturalización de las proteínas provoca la pérdida de la estructura nativa

La desnaturalización se produce cuando una proteína pierde sus estructuras secundaria, terciaria y/o cuaternaria nativas. La desnaturalización no rompe necesariamente la estructura primaria. El **estado desnaturalizado** implica siempre la pérdida de la función de la proteína. Sin embargo, la pérdida de la función no es necesariamente sinónimo de desnaturalización, ya que pequeños cambios conformacionales también pueden dar lugar a la pérdida de la función. Un cambio en la conformación de una sola cadena lateral del sitio activo de un enzima o un cambio en el estado de protonación de una cadena lateral puede tener como resultado la pérdida de actividad, aunque no provoquen la pérdida total de la estructura proteica nativa.

Aún cuando las diferencias conformacionales entre la estructura desnaturalizada y la nativa pueden ser sustanciales, la diferencia de energía libre entre estas estructuras puede ser tan pequeña como la energía libre de tres o cuatro enlaces no covalentes. Por lo tanto, la pérdida de un solo puente de hidrógeno o de una interacción electrostática o hidrofóbica puede provocar la desestabilización de una estructura plegada. A su vez, un cambio en la estabilidad de un enlace no covalente puede deberse a un

TABLA 3.16 Radios de enlace covalente y radios de van der Waals de átomos seleccionados

Átomo	*Radio covalente (Å)*	*Radio de van der Waals (Å)*[a]
Carbono tetraédrico	0,77	2,0
Carbono (aromático)	0,69 a lo largo del enlace doble 0,73 a lo largo del enlace sencillo	1,70
Carbono (amida)	0,72 al N amídico 0,67 al oxígeno 0,75 al C de la cadena	1,50
Hidrógeno	0,33	1,0
Oxígeno (—O—)	0,66	1,35
Oxígeno (=O)	0,57	1,35
Nitrógeno (amida)	0,60 al C amídico 0,70 al H del enlace de hidrógeno 0,70 al C de la cadena	1,45
Azufre, diagonal	1,04	1,70

Fuente: Fasman, G. D. (Ed.), *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,* 3rd ed., Sect. D, Vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press, 1976, p. 221.
[a] La distancia de contacto de van der Waals es la suma de los dos radios de van der Waals de los dos átomos próximos.

cambio de pH, de fuerza iónica o de temperatura. La unión de grupos prostéticos, cofactores y sustratos también afecta a la estabilidad de la conformación nativa.

La afirmación de que la rotura de un simple enlace no covalente en una proteína puede producir la desnaturalización de la misma está aparentemente en contradicción con la observación de que la secuencia de aminoácidos de una proteína puede a menudo modificarse extensamente sin pérdida de la estructura proteica. La clave para la solución de esta aparente contradicción radica en la palabra "esencial". Muchas interacciones no covalentes no son esenciales para la estabilidad estructural de la conformación nativa de una proteína. Sin embargo, la sustitución o modificación de un aminoácido esencial que proporciona una interacción no covalente crítica, sin una interacción estabilizadora compensatoria, afectará espectacularmente a la estabilidad de una estructura proteica nativa.

La concentración de una proteína en la célula está controlada por sus velocidades de síntesis y de degradación (Figura 3.53). En muchos casos, la desnaturalización de una proteína constituye la etapa limitante de la velocidad de su degradación. Los enzimas y orgánulos celulares encargados de digerir las proteínas "reconocen" las conformaciones proteicas desnaturalizadas y las eliminan rápidamente. En situaciones experimentales, las proteínas pueden desnaturalizarse con urea o detergentes (dodecil sulfato sódico, clorhidrato de guanidina) que debilitan los enlaces hidrofóbicos de las proteínas. Estos reactivos estabilizan el estado desnaturalizado y desplazan el equilibrio hacia la forma desnaturalizada de la proteína. La adición de una base fuerte, ácido o disolvente orgánico, o el calentamiento a temperaturas por encima de 60 °C son también métodos comunes para desnaturalizar las proteínas.

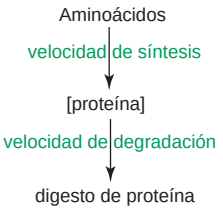


FIGURA 3.53
La concentración estacionaria de una proteína está determinada por sus velocidades de síntesis y de desnaturalización.

3.8 ASPECTOS DINÁMICOS DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

Mientras que los experimentos de difracción de rayos X de alta resolución proporcionan las coordenadas de cada átomo de una estructura proteica, los resultados experimentales obtenidos mediante RMN, espectroscopia de fluorescencia y la dependencia de la temperatura de la difracción de rayos X ponen de manifiesto que los átomos de una molécula proteica plegada tienen un movimiento dinámico similar al de un fluido, y no se encuentran en una posición estática única. Más que una posición exacta, las coordenadas atómicas obtenidas por difracción de rayos X representan la posición de cada átomo promediada en el tiempo. El intervalo de tiempo en el que se promedia la posición es el tiempo invertido en recoger los datos, tiempo que puede llegar a ser de varios días. Por lo tanto, la conformación activa puede diferir de la conformación promediada. La estructura de rayos X muestra también pequeños "defectos" en el empaquetamiento de la estructura plegada, lo que indica la existencia de "agujeros" en la estructura que proporcionan el espacio necesario para la flexibilidad de la proteína. El concepto de que cada átomo de una proteína está en constante movimiento, tal como lo están las moléculas en un fluido, aunque restringido por los enlaces covalentes y las estructuras secundaria y terciaria, es un aspecto importante de la estructura de las proteínas.

Los cálculos teóricos de **dinámica molecular** describen los cambios en las coordenadas de los átomos de la estructura proteica plegada y en la posición de regiones de la estructura debidos a la suma de los movimientos de los átomos en esa región. El movimiento dinámico se calcula resolviendo las ecuaciones de movimiento de Newton de forma simultánea para todos los átomos de la proteína y del disolvente que interaccionan con ésta. Las funciones de energía utilizadas en la ecuación incluyen las energías los enlaces covalentes y los no covalentes, debidas a fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. A los átomos individuales se les asigna al azar una velocidad a partir de una distribución teórica y, seguidamente, se utilizan las ecuaciones de Newton para "relajar" el sistema a una "temperatura" determinada. El cálculo es muy laborioso, aun cuando se limite a unos pocos centenares de picosegundos (1 ps = 10^{-12} s) de dinámica proteica, y frecuentemente requiere superordenadores. Estos cálculos indican que, en promedio, los átomos de una proteína oscilan en una distancia de 0,7 Å, en una escala de picosegundos. Algunos átomos o grupos de átomos se desplazan distancias menores o mayores que las calculadas como promedio (Figura 3.54).

El movimiento neto de cualquier segmento de un polipéptido en el tiempo es el resultado de la suma de las fuerzas debidas a las oscilaciones atómicas rápidas, a

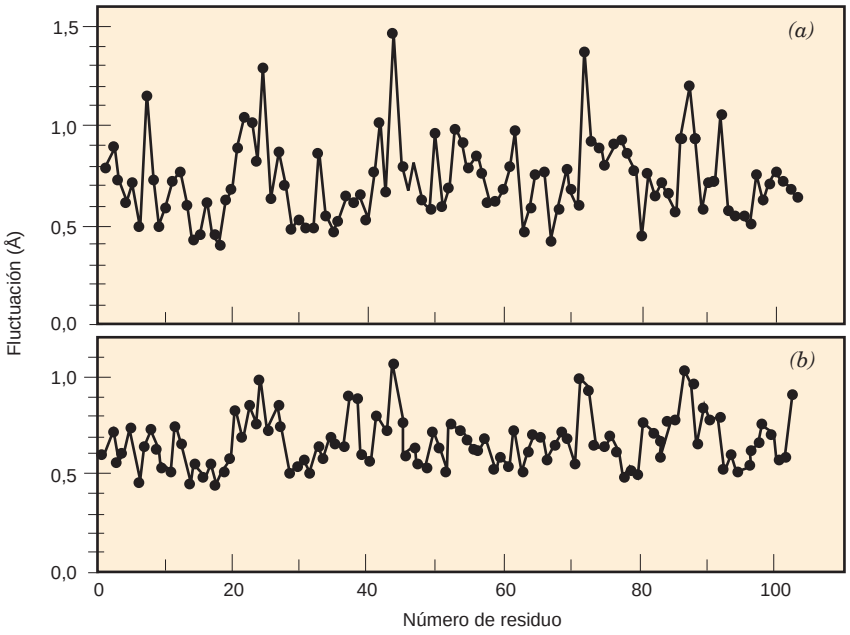


FIGURA 3.54
Fluctuaciones de la estructura del citocromo *c*.
(*a*) Fluctuaciones calculadas en una escala de tiempo de picosegundos para los carbonos α de cada uno de los residuos aminoácidos de la estructura plegada del citocromo *c*, y (*b*) fluctuaciones observadas experimentalmente de cada carbono α determinadas a partir de la dependencia de la temperatura del patrón de difracción de rayos X de la proteína. El citocromo *c* tiene 103 residuos aminoácidos. El eje x representa los residuos aminoácidos del citocromo *c* desde el 1 al 103, y el eje y las distancias de fluctuación en angstroms. *Modificado de Karplus, M. y McCammon, J. A.* Annu. Rev. Biochem. *53:263, 1983.*

las vibraciones locales y a los movimientos elásticos de grupos de átomos unidos covalentemente. Estos movimientos en el interior densamente empaquetado de una molécula de proteína a menudo permiten el giro de los anillos aromáticos planos de las tirosinas del interior de la molécula. Las fluctuaciones de pequeña amplitud proporcionan el "lubricante" necesario para movimientos amplios de la proteína, tales como el movimiento de dominios y los cambios de la estructura cuaternaria que se observan, por ejemplo, en la unión del O_2 a la hemoglobina (véase el Capítulo 9). El comportamiento dinámico de las proteínas interviene en los cambios conformacionales inducidos por la unión de un sustrato, un inhibidor o un fármaco a un enzima o a un receptor, en la generación de efectos alostéricos en las hemoglobinas, en la transferencia de electrones en los citocromos y en la formación de complejos supramoleculares tales como los virus. Los movimientos también pueden tener un papel funcional en los mecanismos de acción de las proteínas.

3.9 | MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y LA ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Separación de proteínas basada en la carga

En la **electroforesis**, la proteína, disuelta en una disolución tamponada a un pH determinado, se coloca en un campo eléctrico. En función de la relación entre el pH del tampón y el p*I* de la proteína, la molécula se moverá hacia el cátodo (−), hacia el ánodo (+), o permanecerá estacionaria (pH = p*I*). Como soporte se utilizan geles poliméricos (p. ej., poliacrilamida), almidón o papel. Los soportes inertes se saturan con solución tampón, se aplica la muestra de proteínas sobre el soporte, se establece un campo eléctrico a través del soporte y las proteínas cargadas se desplazan hacia el polo de carga opuesta.

Una técnica electroforética con una resolución sumamente elevada es el **enfoque isoeléctrico**, en la que se utilizan mezclas de anfolitos formados por ácidos poliamino–policarboxílicos con un intervalo definido de valores de p*I* para establecer un gradiente de pH a través del campo eléctrico aplicado. Una proteína cargada se desplaza a través del gradiente de pH en el campo eléctrico hasta que alcanza una región cuyo pH en el gradiente sea igual al valor de su p*I*. En este punto, la proteína se mantiene estacionaria y se puede visualizar (Figura 3.55). Con el gradiente de pH adecuado se pueden separar proteínas cuyos valores de p*I* sólo difieren en 0,0025.

La cromatografía en columna de **intercambio iónico** se utiliza para la separación preparativa de proteínas basada en su carga.

Las resinas de intercambio iónico consisten en materiales insolubles (agarosa, poliacrilamida, celulosa y vidrio) que contienen grupos cargados (Figura 3.56). Las

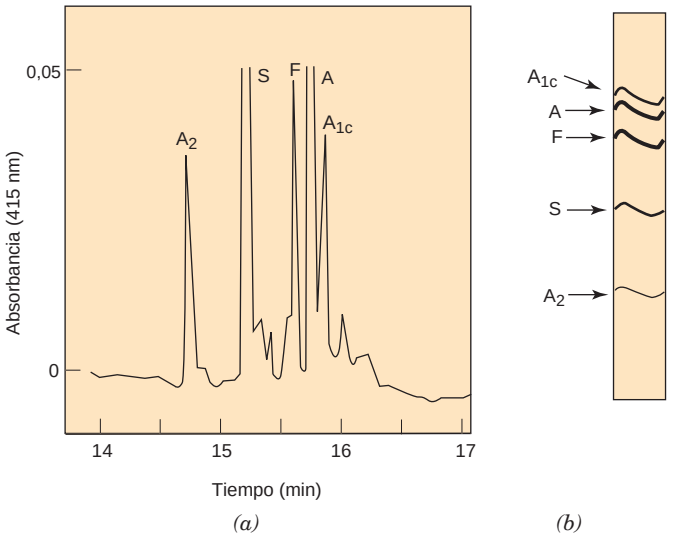


FIGURA 3.55
Enfoque isoeléctrico de hemoglobinas de pacientes heterocigóticos para HbS y β-talasemia.
La figura muestra la separación mediante enfoque isoeléctrico de HbA_{1c} (HbA glucosilada en el extremo NH_2, véase Apli. Clín. 3.7), HbA de adulto normal, HbF fetal, HbS de células falciformes (véase Apli. Clín. 3.3), y HbA_2 minoritaria en adultos. (*a*) Enfoque isoeléctrico realizado mediante electroforesis capilar en un intervalo de pH entre 6,7 y 7,7 y detección de bandas a 415 nm. (*b*) Enfoque isoeléctrico realizado sobre gel con el Phast System de Pharmacia; el intervalo de pH es 6,7–7,7.
Tomado de Molteni, S., Frischknecht, H. y Thormann, W. Electrophoresis ***15****:22, 1994 (Figura 4, partes A y B).*

resinas cargadas negativamente fijan fuertemente los cationes y se conocen como **resinas de intercambio catiónico**. Las resinas cargadas positivamente fijan fuertemente los aniones y se denominan **resinas de intercambio aniónico**. El grado de retardo de una proteína (o de un aminoácido) en una resina depende de la magnitud de la carga de la proteína al pH del experimento. Las moléculas con la misma carga que la resina se eluyen primero en una banda única, seguidas por las proteínas con carga opuesta a la de la resina, que se eluirán en un orden basado en la densidad de carga de la proteína (Figura 3.57). Cuando es difícil eluir una molécula unida a la resina debido a la fuerza de la interacción atractiva entre la molécula ligada y la resina, pueden utilizarse cambios sistemáticos de pH o de fuerza iónica para debilitar la interacción. Por ejemplo, un gradiente de pH creciente a través de una resina de intercambio catiónico reducirá la diferencia entre el pH de la disolución y el p*I* de la proteína ligada. Esta disminución de la diferencia entre pH y p*I* reduce la magnitud de la carga neta de la proteína, y disminuye la fuerza de interacción de carga entre la proteína y la resina. Un gradiente creciente de fuerza iónica también disminuye las interacciones entre las cargas y permite la elución de los electrolitos fuertemente ligados a la resina.

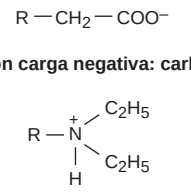


FIGURA 3.56
Dos ejemplos de ligandos cargados utilizados en cromatografía de intercambio iónico.

Electroforesis capilar

La electroforesis en un tubo capilar de sílice fundida presenta una elevada eficiencia de separación, utiliza cantidades muy pequeñas de muestra y el análisis requiere solamente algunos minutos. Se llena un largo tubo capilar con el medio de electroforesis, se inyecta una estrecha banda de muestra en el extremo del tubo correspondiente al ánodo, y las moléculas de la muestra se separan por su movilidad en dirección al polo cargado negativamente. La superficie de sílice fundida del capilar tiene cargas negativas que inmovilizan una capa de cationes. Cuando se aplica el campo eléctrico, una capa difusa adyacente de cationes se desplaza hacia el cátodo, lo que provoca un flujo de disolvente en la misma dirección. Este flujo electroosmótico genera una "corriente" que transporta las moléculas de las sustancias analizadas (analitos) hacia el cátodo, independientemente de su carga (Figura 3.58). Las moléculas con una elevada relación entre carga positiva y masa se mueven con la corriente y presentan la mayor movilidad, seguidas por las moléculas neutras. Las moléculas aniónicas son repelidas por el cátodo y se mueven en contra del flujo electroosmótico. Sin embargo, la corriente electroosmótica hacia el cátodo es superior a cualquier migración negativa, y los aniones se desplazan hacia el cátodo, aunque a una velocidad menor que la de las moléculas catiónicas o neutras.

En la electroforesis zonal, las separaciones se realizan en presencia de un único tampón. La electroforesis capilar puede realizarse en presencia de anfolitos para separar las proteínas por enfoque isoeléctrico, en presencia de un gel poroso para separarlas por masa molecular, o en presencia de un componente micelar para separarlas por hidrofobicidad. Los detectores que utilizan luz UV, fluorescencia, espectroscopia Raman, detección electroquímica o espectroscopia de masa convierten la electroforesis capilar en un método sensible y versátil.

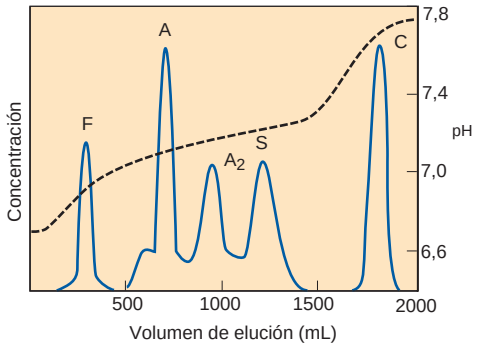


FIGURA 3.57
Ejemplo de cromatografía de intercambio iónico.
Diagrama de elución de una mezcla artificial de hemoglobinas F, A_1, A_2, S y C en carboximetil–Sephadex C-50.
De Dozy, A. M. y Juisman, T. H. J. J. Chromatogr. *40:62, 1969.*

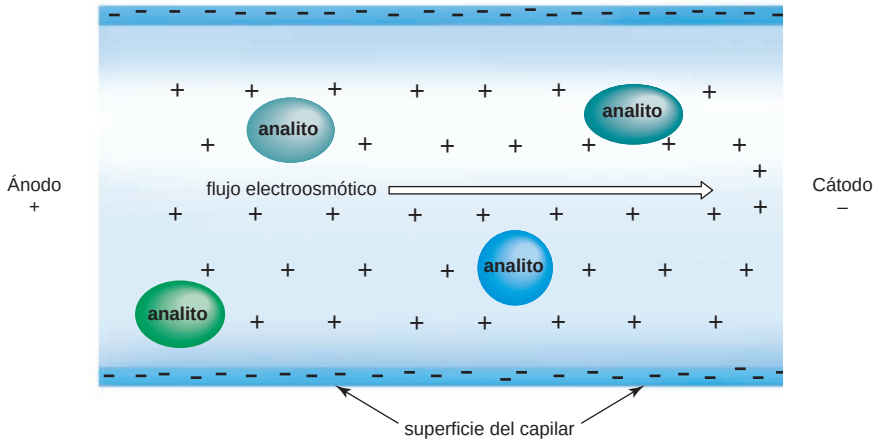


FIGURA 3.58
Generación de un flujo electroosmótico hacia el cátodo en la electroforesis capilar.

Separación de proteínas basada en la masa molecular o en el tamaño

Ultracentrifugación: definición del coeficiente de Svedberg

Una proteína sometida a una fuerza centrífuga se desplaza en la dirección de la fuerza a una velocidad que depende de su masa. La velocidad se mide con un sistema óptico adecuado, y a partir de la velocidad se calcula el coeficiente de sedimentación en **unidades Svedberg** (unidades de 10^{-13} s). En la ecuación (Figura 3.59), v es la velocidad medida experimentalmente del movimiento de la proteína, ω la velocidad angular del rotor de la centrífuga y r la distancia desde el centro del tubo en el que está colocada la proteína al centro de rotación. En las proteínas se han encontrado coeficientes de sedimentación entre 1 y 200 unidades Svedberg (S) (Tabla 3.17). Se han deducido ecuaciones que relacionan el coeficiente de sedimentación con la masa molecular de una proteína. Una de las ecuaciones más sencillas se muestra en la Figura 3.60, en la que R es la constante de los gases, T la temperatura, s el coeficiente de sedimentación, D el coeficiente de difusión de la proteína, $\bar{v}$ el volumen específico parcial de la proteína y ρ la densidad del disolvente. Las magnitudes D y $\bar{v}$ han de medirse en experimentos independientes. La ecuación presupone que la proteína tiene una geometría esférica. A menudo sólo se determina el coeficiente de sedimentación, porque las mediciones independientes de D y $\bar{v}$ son difíciles. El coeficiente de sedimentación de una proteína es una medida cualitativa de su masa molecular.

$$s = \frac{v}{\omega^2 r}$$

FIGURA 3.59
Ecuación para el cálculo del coeficiente de Svedberg.

$$\text{Masa molecular} = \frac{RTs}{D\,(1 - \bar{v}\rho)}$$

FIGURA 3.60
Ecuación que relaciona el coeficiente de Svedberg con la masa molecular.

Cromatografía de exclusión molecular

Para separar proteínas según su tamaño mediante cromatografía en columna se utiliza frecuentemente un gel poroso en forma de pequeñas esferas insolubles. Las pro-

TABLA 3.17 Coeficientes Svedberg de algunas proteínas de diferente masa molecular.

Proteína	$s_{20,} \times 10^{-13}$ $(cm\ s^{-1}\ dyn^{-1})^a$	*Masa molecular*
Lisozima	2,19	15 000–16 000
Albúmina	4,6	69 000
Inmunoglobulina G	6,6–7,2	153 000
Fibrinógeno	7,63	341 000
C1q (factor del complemento)	11,1	410 000
α_2-Macroglobulina	19,6	820 000
Inmunoglobulina M	18–20	1 000 000
Factor VIII de la coagulación de la sangre	23,7	1 120 000

Fuente: Fasman, G. D. (Ed.). *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,* 3rd ed., Sect. A, Vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press, 1976, p. 242.

[a] $s_{20,} \times 10^{-13}$ es el coeficiente de sedimentación en unidades Svedberg referidas al agua a 20 °C y extrapolado a concentración cero de proteína.

teínas pequeñas penetran por los poros del gel, teniendo así un mayor volumen de disolvente por el que viajar en la columna que las proteínas grandes, las cuales son excluidas de los poros por motivos estéricos. En consecuencia, una mezcla de proteínas se separará en función del tamaño. Las proteínas más grandes eluyen primero, seguidas por las más pequeñas, que se retrasan por su accesibilidad a un volumen mayor de disolvente (Figura 3.61). Al igual que con la ultracentrifugación se presupone una geometría determinada de la proteína en la determinación de la masa molecular. Las proteínas alargadas dan masas moleculares anómalas cuando se analizan con una gráfica estándar confeccionada con proteínas de geometría esférica.

Electroforesis sobre gel de poliacrilamida en presencia de un detergente

Si se añade un detergente cargado a un ensayo electroforético de proteínas y la electroforesis se realiza en un soporte con propiedades de tamiz molecular, la separación de las proteínas se basa en el tamaño y no en la carga. Un detergente utilizado frecuentemente es el **dodecil sulfato sódico (SDS)** y como soporte tamizante la **poliacrilamida entrecruzada**. Los dodecil sulfatos son alquil sulfatos anfifílicos de 12 carbonos que estabilizan la proteína desnaturalizada formando una capa de solvatación micelar cargada de SDS alrededor de la cadena polipeptídica. La carga inherente de la cadena polipeptídica es obliterada por moléculas del SDS cargadas negativamente, y cada agregado de proteína–SDS solubilizado tiene la misma carga por unidad de volumen. Las partículas cargadas negativamente se mueven a través del gel de poliacrilamida hacia el ánodo. La poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, y los complejos proteína–micela se separan en función de su tamaño; las proteínas de mayor masa se retrasan. En un experimento de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, una banda única se utiliza a menudo como criterio de pureza de la proteína. La conformación de la estructura nativa no interviene en el cálculo de la masa molecular, que se determina por comparación con patrones conocidos igualmente desnaturalizados. Los detergentes disocian la estructura cuaternaria en sus subunidades constitutivas; con este método sólo se obtienen las masas moleculares de las subunidades de una proteína.

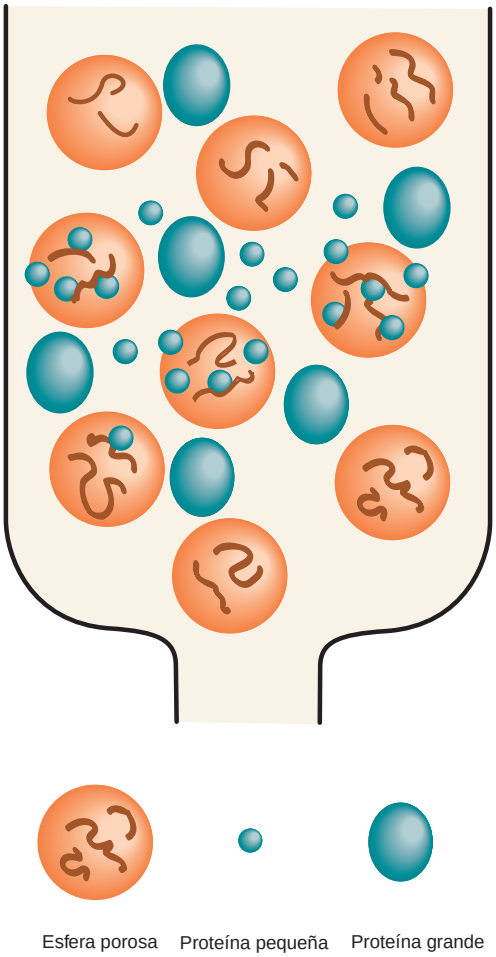


FIGURA 3.61
Cromatografía de exclusión molecular. Una proteína pequeña puede entrar en las partículas porosas del gel y se retrasará en la columna con relación a una proteína mayor que no pueda entrar en las partículas porosas del gel.

Las técnicas cromatográficas de HPLC separan aminoácidos, péptidos y proteínas

En la **cromatografía líquida de alta resolución** (HPLC), un disolvente líquido que contiene la mezcla de las moléculas a identificar se hace pasar a través de una columna densamente empaquetada con pequeñas esferas de resina insoluble. En la cromatografía en columna, cuanto más pequeñas sean las partículas de resina y más densamente empaquetadas se encuentren, mejor será la resolución de esta técnica separativa. En la HPLC, la resina está tan densamente empaquetada que el líquido debe ser bombeado a través de la columna a elevada presión. Por este motivo en HPLC se emplean bombas de alta presión de precisión, y los conductos y las columnas son de metal y no de cristal o plástico como en la cromatografía a presión atmosférica. Las partículas de resina pueden recubrirse con grupos químicos cargados para separar los compuestos por intercambio iónico, o con grupos hidrofóbicos para retrasar las moléculas apolares hidrofóbicas. En la cromatografía hidrofóbica, los compuestos apolares fuertemente retenidos se eluyen de la matriz hidrofóbica con disolventes acuosos que contienen porcentajes variables de un reactivo orgánico. Cuanto más elevada sea la proporción de disolvente orgánico en el eluyente, más rápida será la elución del componente apolar de la resina hidrofóbica. Este último tipo de cromatografía sobre partículas de resina apolar se denomina **HPLC de fase inversa** (Figura 3.62). Las separaciones por HPLC ofrecen una resolución y reproducibilidad extremadamente elevadas.

Cromatografía de afinidad

Las proteínas tienen una alta afinidad por sus sustratos, grupos prostéticos, receptores de membrana, inhibidores no covalentes específicos y anticuerpos obtenidos contra ellas. Estos compuestos de alta afinidad pueden unirse de forma covalente a una resina insoluble. Esta resina modificada puede utilizarse para purificar la proteína conjugada mediante cromatografía en columna. En una mezcla de proteínas eluída a través de la resina, la proteína de interés es retardada selectivamente.

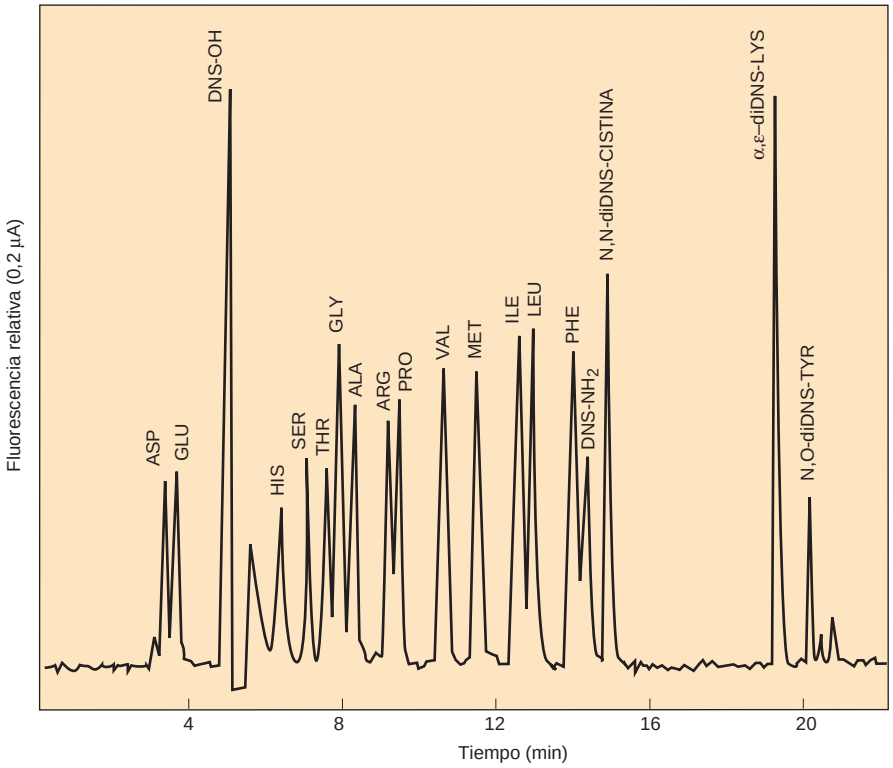


FIGURA 3.62
Separación de aminoácidos utilizando HPLC de fase inversa. El eje x corresponde al tiempo de elución de la columna.
Los aminoácidos se modifican mediante reacción con cloruro de dansilo (DNS) para que emitan fluorescencia que se utiliza para detectarlos a medida que eluyen de la columna.
Reproducido con permiso de Hunkapiller, M. W., Strickler, J. E. y Wilson, K. J. Science *226:304, 1984. Copyright © 1984 by American Association for the Advancement of Science.*

Metodología para la purificación de proteínas

Una proteína debe purificarse antes de proceder a una caracterización fiable de su composición química, estructura y función. Debido a que las células vivas contienen millares de proteínas genéticamente distintas, la purificación de una sola proteína a partir de una mezcla de proteínas celulares puede ser difícil. La primera tarea en la purificación de una proteína es el desarrollo de un método fácil para determinarla. Un ensayo, tanto si utiliza la velocidad de transformación de un sustrato a producto, una reacción antígeno–anticuerpo o una respuesta fisiológica en un sistema de ensayo animal, debe dar una medida cuantitativa de actividad por unidad de concentración de proteína. Esta cantidad se conoce como **actividad específica** de la muestra. El objetivo de una purificación es incrementar la actividad específica de una muestra hasta un valor igual al de la actividad específica esperada para la proteína pura. Un protocolo típico de purificación de una proteína celular soluble implica la rotura de la membrana celular, seguida de una centrifugación diferencial en un gradiente de densidad para aislar la actividad proteica de las partículas subcelulares o agregados de elevada masa molecular. La purificación posterior puede utilizar la precipitación selectiva por adición de sales inorgánicas o con disolventes orgánicos. La purificación final incluye una combinación de técnicas de separación basadas en la carga molecular, el tamaño molecular y/o la afinidad.

Las técnicas de la proteómica permiten determinar todas las proteínas expresadas en una célula o en un tejido en un solo ensayo

El número estimado de genes distintos del genoma humano es de entre 30 000 y 80 000. Dado que pueden obtenerse múltiples productos proteicos de un solo gen, el número de proteínas distintas presentes en el ser humano probablemente supere las 250 000. La **proteómica** es la ciencia que determina exactamente las proteínas que se producen en una célula o en un tejido en unas condiciones determinadas.

Cualquier célula o tejido puede expresar millares de proteínas diferentes simultáneamente. Para entender las propiedades de una célula o un tejido es importante determinar el tipo de proteínas expresadas y cómo el patrón de expresión cambia con el desarrollo, la diferenciación y la enfermedad. Se han desarrollado técnicas para

analizar los mRNA expresados en células y tejidos en un solo ensayo de hibridación a un microchip de DNA. Más recientemente se han desarrollado técnicas para analizar los productos génicos activos, es decir, las proteínas expresadas por las células y los tejidos, mediante **electroforesis de 2D**. En esta técnica, primero se extraen las proteínas de las células o de los tejidos y luego se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas se separan en la primera dimensión por diferencias de pH isoeléctrico (p*I*, véase Enfoque isoeléctrico). A continuación el gel se gira en otra dimensión y se añade dodecil sulfato sódico (SDS) al tampón. Las proteínas se separan en la segunda dimensión por diferencias de masa molecular (véase Electroforesis en presencia de un detergente). Finalmente se tiñe el gel y se mide la intensidad de cada una de los millares de manchas de proteína para determinar si una proteína determinada se expresa y cuál es su concentración (Figura 3.63).

Determinar la identidad de cada una de las manchas de proteína de un gel bidimensional no es tarea fácil. El patrón del gel de 2-D, si se realiza en condiciones estándar, puede compararse con los patrones obtenidos por laboratorios de referencia que hayan determinado la identidad de la mayoría de los componentes del patrón de 2-D de un determinado tipo celular. Estos patrones de referencia están en Internet. Para la identificación experimental se pueden extraer las manchas del gel e hidrolizar la proteína para obtener pequeños péptidos por digestión enzimática proteolítica (p. ej., con tripsina o quimotripsina), que pueden ser analizados por espectroscopia de masas. La secuencia de aminoácidos de muchos de estos pequeños fragmentos puede determinarse rápidamente por espectroscopia de masas.

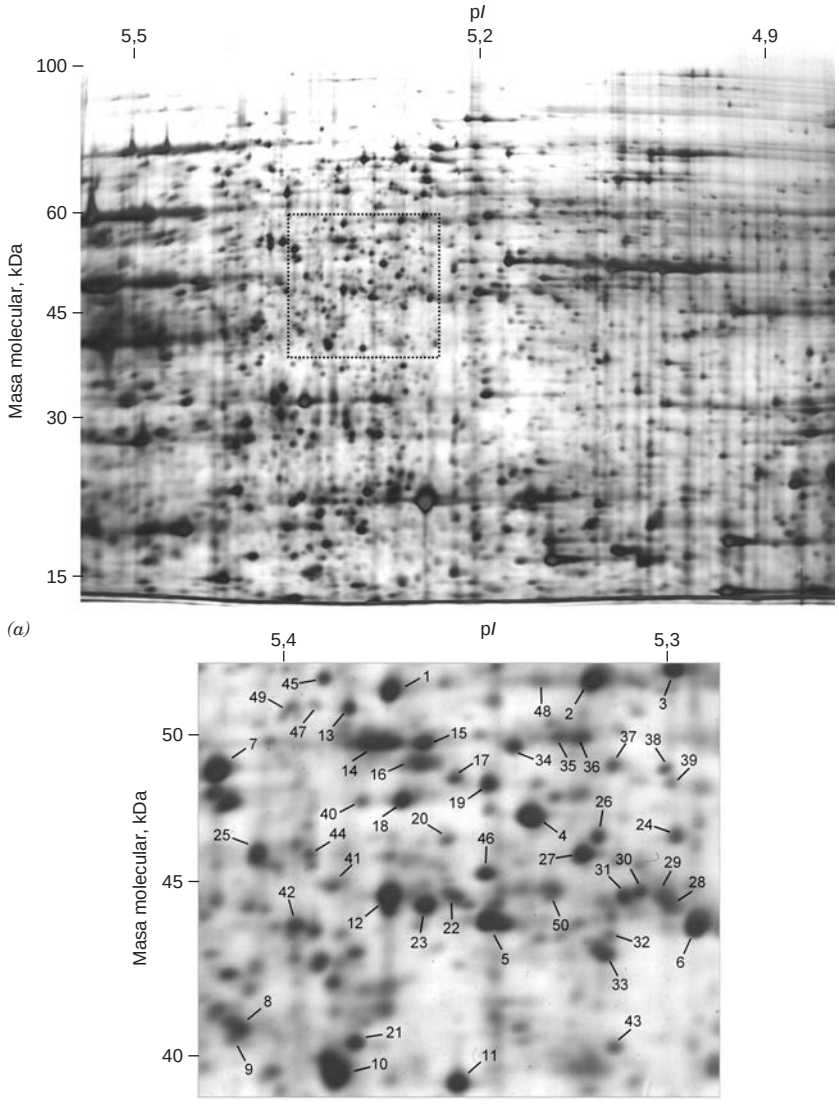
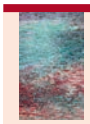


FIGURA 3.63
Separación bidimensional (2D) de las proteínas expresadas por células en cultivo.
(*a*) Proteínas solubles de un extracto celular (500 μg) cargadas en un gel y separadas por enfoque isoeléctrico (entre pH 4,9 y 5,5) en la dirección horizontal y por masa molecular en la dirección vertical (electroforesis en presencia del detergente SDS). Se observan más de 1500 proteínas en el gel teñido con plata. (*b*) Región del gel ampliada para mostrar el detalle. Las proteínas numeradas fueron analizadas mediante hidrólisis con una proteasa y espectrometría de masas para la determinación parcial de su secuencia y posterior identificación.
Reproducido con autorización de Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y y Aebersold, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *97: 9390, 2000.*



APLICACIÓN CLÍNICA 3.9

Uso del análisis de aminoácidos en el diagnóstico médico

Hay una serie de anomalías clínicas en las que se encuentra una alta concentración de aminoácidos en el plasma o en la orina. Una concentración anormalmente alta de un aminoácido en la orina se denomina aminoaciduria. Los pacientes de fenilcetonuria carecen de cantidades suficientes del enzima fenilalanina hidroxilasa, que cataliza la transformación de fenilalanina en tirosina; como consecuencia, se acumulan elevadas concentraciones de fenilalanina, fenilpiruvato y fenil-lactato en el plasma y en la orina. La fenilcetonuria aparece clínicamente en las primeras semanas después del nacimiento, y si no se suministra al lactante una dieta especial, puede producirse un retraso mental grave (véase Apli. Clín. 18.5). La cistinuria es un defecto, transmitido genéticamente, del sistema de transporte de membrana de la cistina y los aminoácidos básicos (lisina, arginina y el aminoácido derivado ornitina) en las células epiteliales. En la orina, se excretan grandes cantidades de estos aminoácidos. Otros síntomas de esta enfermedad son consecuencia de la formación de cálculos renales compuestos de cistina precipitada en el riñón (véase Apli. Clín. 5.3). La enfermedad de Hartnup es un defecto transmitido genéticamente del transporte de los aminoácidos neutros (ácidos monoamino monocarboxílicos) en las células epiteliales, que en esta dolencia se encuentran en elevadas concentraciones en la orina. Los síntomas físicos de la enfermedad están causados principalmente por un déficit de triptófano. Estos síntomas pueden incluir una erupción parecida a la pelagra (la nicotinamida proviene en parte del triptófano) y ataxia cerebelar (movimientos musculares irregulares y bruscos) debido a los efectos tóxicos del indol procedente de la degradación bacteriana de triptófano no absorbido presente en grandes cantidades en el intestino (véase Apli. Clín. 26.2). El síndrome de Fanconi es una aminoaciduria generalizada asociada con hipofosfatemia y una elevada excreción de glucosa. La reabsorción anormal de aminoácidos, fosfato y glucosa por las células tubulares es el defecto subyacente.

La técnica se denomina **huella de masas peptídica**. Con estas secuencias se puede buscar en las bases de datos de secuencias génicas para identificar la proteína extraída del gel de 2-D. Se dispone de robots para realizar todas las operaciones, desde la extracción de la proteína de los geles hasta la identificación. Con esta metodología es posible identificar millares de proteínas expresadas.

Estas técnicas a menudo no logran identificar proteínas poco abundantes en células o tejidos. Ciertos tipos de proteínas son difíciles de analizar debido a su baja solubilidad, baja carga molecular o muy baja masa molecular. Por ejemplo, las proteínas integrales de membrana son muy hidrofóbicas y no son solubles en los disolventes para el enfoque isoeléctrico.

Determinación de la composición de aminoácidos de una proteína

La determinación de la composición de aminoácidos es una parte esencial del estudio de las propiedades estructurales y fisiológicas de una proteína. La proteína se hidroliza en los aminoácidos que la constituyen, calentándola a 110°C en HCl 6 N durante 18-36 h en un tubo cerrado al vacío para evitar la degradación de las cadenas laterales de los aminoácidos susceptibles de oxidación por el oxígeno atmosférico. Con este método se destruye el triptófano, y para su análisis hay que utilizar otros procedimientos. Las amidas de las cadenas laterales de la asparagina y de la glutamina se hidrolizan a aspartato, glutamato y amoníaco libre; de modo que se contabilizan en el análisis junto con el contenido en ácido aspártico y ácido glutámico.

Los procedimientos comunes para la identificación de aminoácidos utilizan la cromatografía de intercambio iónico o la HPLC de fase inversa para separar los aminoácidos, que reaccionan posteriormente con ninhidrina, fluorescamina, cloruro de dansilo u otros reactivos cromofóricos o fluorofóricos para la cuantificación (Figura 3.62). Mediante alguno de estos procedimientos de modificación, los aminoácidos pueden identificarse a concentraciones sumamente bajas, del orden de $0{,}5 \times 10^{-12}$ moles (pmol). El análisis de la composición de aminoácidos de los fluidos fisiológicos (p. ej., sangre y orina) se utiliza en el diagnóstico de enfermedades (véase la Apli. Clín. 3.9).

Técnicas para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína

La posibilidad de clonar genes ha permitido determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína a partir de las secuencias de DNA o RNA mensajero (véase el Capítulo 7). Este es un método mucho más rápido para obtener una secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la secuenciación de proteínas es necesaria para determinar modificaciones de la estructura proteica que se produzcan con posterioridad a su biosíntesis, para identificar una parte de la secuencia de la proteína a fin de clonar

su gen, y para identificar una proteína como el producto de un gen determinado (véase el Capítulo 6). La determinación de la estructura primaria de una proteína requiere una proteína pura. También es necesario determinar el número de cadenas de la proteína. Las cadenas individuales se purifican mediante las mismas técnicas empleadas en la purificación de la proteína completa. Si las cadenas están unidas covalentemente por puentes disulfuro, estos enlaces tienen que romperse (Figura 3.64).

La secuenciación de las cadenas polipeptídicas se realiza comúnmente mediante la **reacción de Edman** o por **espectroscopia de masas**. En la reacción de Edman, la cadena polipeptídica se trata con fenilisotiocianato, que reacciona con el aminoácido NH_2-terminal. Las condiciones ácidas catalizan una ciclación intramolecular que corta el aminoácido NH_2-terminal de la cadena polipeptídica, liberándolo en forma de derivado de feniltiohidantoína (Figura 3.65). Este derivado del aminoácido NH_2-terminal puede separarse por cromatografía e identificarse mediante patrones. Se aísla seguidamente la cadena polipeptídica restante y se repite la reacción de Edman para identificar el siguiente aminoácido NH_2-terminal. Esta serie de reacciones puede repetirse, teóricamente, hasta que se haya determinado la secuencia completa de la cadena polipeptídica, pero, en condiciones favorables, puede llevarse a cabo sólo para 30 ó 40 aminoácidos de la cadena polipeptídica. Llegados a este punto, las impurezas generadas por las reacciones incompletas en la serie de reacciones impiden realizar nuevos **ciclos de Edman**. Las cadenas polipeptídicas que contengan más de 30 ó 40 aminoácidos se han de hidrolizar en fragmentos más pequeños y secuenciarse por partes. Para la secuenciación por espectroscopia de masas también es necesario romper las cadenas polipeptídicas largas en fragmentos menores antes del análisis.

Para romper las cadenas polipeptídicas en fragmentos más pequeños se utilizan tanto métodos enzimáticos como químicos (Figura 3.66). El enzima **tripsina** cataliza preferentemente la hidrólisis del enlace peptídico del lado del COOH de los residuos aminoácidos básicos de lisina y arginina de las cadenas polipeptídicas. La **quimotripsina** hidroliza enlaces peptídicos del lado del COOH de residuos aminoácidos con cadenas laterales apolares de gran tamaño. Otros enzimas proteolíticos cortan las cadenas polipeptídicas por el lado COOH terminal de ácido glutámico y ácido aspártico. El **bromuro de cianógeno** rompe específicamente el enlace peptídico del lado COOH de residuos de metionina en el interior de las cadenas polipeptídicas (Figura 3.66). Un polipéptido grande se somete a **hidrólisis parcial** con un reactivo de corte específico, se separan los segmentos y se determina la secuencia de aminoácidos de cada uno de ellos mediante la reacción de Edman o espectroscopia de masas. Para ordenar de forma correcta los segmentos peptídicos secuenciados y obtener la secuencia completa del polipéptido original, se somete una muestra del polipéptido original a una segunda hidrólisis parcial mediante un reactivo hidrolítico diferente del utilizado inicialmente. Esto produce secuencias solapadas con las del primer conjunto de secuencias, que permiten obtener la secuencia completa (Figura 3.67).

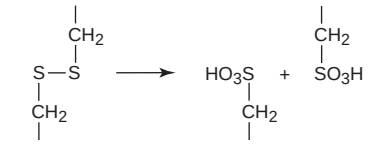


FIGURA 3.64
Rotura de los puentes disulfuro por oxidación a ácido cisteico.

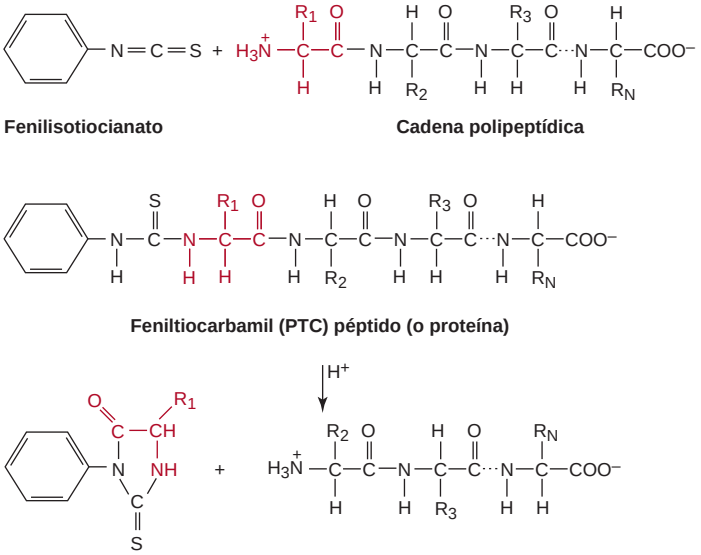
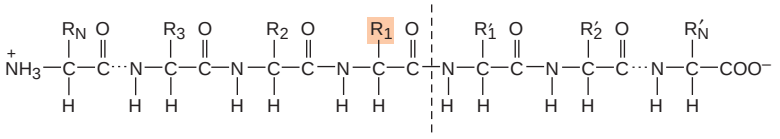


FIGURA 3.65
Reacción de Edman.



R_1	Reactivo
Phe, Tyr, o Trp	Quimotripsina
Arg, Lys	Tripsina
Met	Bromuro de cianógeno
Trp	Ácido *o*-yodosobenzoico
Glu	Endoproteasa V8 de *Staphylococcus aureus*

FIGURA 3.66
Especificidad de algunos reactivos que rompen polipéptidos.

Para determinar la estructura tridimensional de las proteínas se utilizan técnicas de difracción de rayos X

La **difracción de rayos X** permite determinar la estructura tridimensional de las proteínas a una resolución casi atómica. La técnica requiere la obtención de un cristal de proteína que, al contener disolvente, es una disolución concentrada de proteína. El conocimiento actual de los detalles de la estructura de las proteínas obtenido mediante experimentos realizados en el estado cristalino está de acuerdo con otras mediciones físicas de la estructura de proteínas en disolución, tales como las obtenidas por espectroscopia de RMN (véase la p. 152).

La obtención de los cristales de proteína puede ser el aspecto más laborioso del proceso. A diferencia de lo que sucede con la mayoría de los cristales de moléculas pequeñas, un factor importante en la manipulación experimental y computacional de cristales de proteína es la concentración proteica del cristal. Las dimensiones moleculares de las proteínas son un orden de magnitud mayor que las de las moléculas pequeñas, y el empaquetamiento de moléculas de proteína grandes en la red cristalina da lugar a un cristal con grandes "huecos" o canales de disolvente. Un cristal de proteína contiene normalmente un 40–60% de disolvente, y por lo tanto cabe considerarlo como una disolución concentrada, más que como el sólido cristalino rígido que forman la mayoría de las moléculas pequeñas. La presencia de disolvente y de volumen no ocupado en los cristales permite la difusión de inhibidores y sustratos hasta las moléculas de proteína en el "estado cristalino", y la **flexibilidad dinámica** de algunas regiones de la estructura proteica. En el experimento de difracción de rayos X, la flexibilidad puede interpretarse como "desorden", que se utiliza para describir la situación en la que la densidad electrónica observada puede ajustarse a más de una conformación local. El desorden tiene dos explicaciones que conviene distinguir. La primera implica la presencia de dos o más conformaciones moleculares estáticas que están presentes de forma estequiométrica. La segunda responde el margen dinámico real de movimientos que presentan los átomos o grupos de átomos en determinadas regiones de la molécula. La distinción entre las dos posibles causas puede llevarse a cabo experimentalmente, disminuyendo la temperatura ambiental del cristal hasta un punto en el que el desorden dinámico quede "congelado"; por el contrario, el desorden estático persiste, ya que no depende de la temperatura. El análisis del desorden dinámico dependiente de la temperatura mediante mediciones por difracción de rayos X es un método importante para el estudio de la dinámica de proteínas (véase la Sección 3.8).

Las **técnicas de cristalización** han avanzado tanto que en la actualidad se pueden obtener cristales incluso a partir de las proteínas menos abundantes. Se han re-

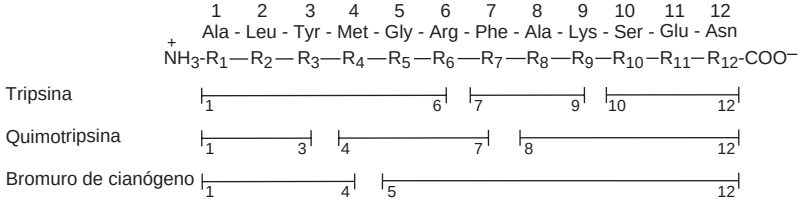


FIGURA 3.67
Ordenamiento de fragmentos peptídicos a partir de secuencias solapadas producidas por proteólisis específica de un péptido

suelto las estructuras de proteínas interesantes en las que se habían sustituido residuos de aminoácidos específicos, de complejos antígeno–anticuerpo y de productos víricos tales como la proteasa necesaria para la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que es el causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Mediante difracción de rayos X se han resuelto muchas proteínas y los datos están almacenados en una base de datos denominada **Protein Data Bank,** a la que se puede acceder fácilmente.

La difracción de rayos X por un cristal se consigue utilizando radiación incidente de una longitud de onda característica (p. ej., cobre, $K_\alpha = 1{,}54$ Å). El haz de rayos X es difractado por los electrones que rodean los núcleos atómicos en el cristal, con una intensidad proporcional al número de dichos electrones. De este modo, la técnica permite deducir la distribución nuclear a partir de la **distribución electrónica** de la molécula. La posición de los núcleos atómicos puede determinarse directamente por **difracción de neutrones**, una técnica interesante pero muy costosa, ya que requiere una fuente de neutrones (reactor nuclear o acelerador de partículas). Con la mayor resolución asequible en este momento para la determinación de estructuras proteicas mediante difracción de rayos X, puede observarse la difracción electrónica de los átomos de C, N, O y S. No se observa la difracción de los átomos de hidrógeno, debido a la baja densidad de electrones; es decir, un único electrón alrededor del núcleo de hidrógeno. Los detectores del haz difractado, normalmente una película fotográfica o detectores electrónicos de área, permiten registrar la amplitud (intensidad) de la radiación difractada en una orientación definida. Sin embargo, los datos no aportan información sobre las fases de la radiación, que son esenciales para la resolución de la estructura proteica. La determinación de los **ángulos de fase** requería la colocación de átomos pesados de alta densidad electrónica (tales como yodo, mercurio o plomo) en la estructura proteica. Con los procedimientos actuales se puede resolver a menudo el problema de la fase sin necesidad de utilizar átomos pesados.

Para entender los procesos que intervienen en la determinación de estructuras tridimensionales conviene tener en cuenta la analogía entre cristalografía de rayos X y microscopia óptica. En microscopia óptica, el haz incidente es reflejado por el objeto en estudio y el rayo reflejado es recondensado por la lente del objetivo, para así formar la imagen del objeto. La analogía es aplicable al haz de rayos X incidente, con la notable salvedad de que no se conoce ningún material que pueda actuar de lente objetivo para la radiación de rayos X. Para sustituir la lente del objetivo, se reconstruyen matemáticamente por **síntesis de Fourier** las mediciones de amplitud y ángulo de fase de la radiación difractada, obteniéndose así un **mapa de densidad electrónica** del objeto difractado. Al principio se utilizan unos pocos centenares de reflexiones para construir un mapa de densidad electrónica de baja resolución. Por ejemplo, en la determinación de una de las primeras estructuras cristalográficas se utilizaron 400 reflexiones para obtener un mapa con una resolución de 6 Å de la proteína mioglobina. A este nivel de resolución es posible localizar claramente la molécula dentro de la celdilla unitaria del cristal, así como estudiar el empaquetamiento global de las subunidades en una proteína con estructura cuaternaria. Con dificultades, se puede averiguar la trayectoria de la cadena polipeptídica de la molécula proteica individual. Utilizando la estructura de baja resolución como base, pueden utilizarse reflexiones adicionales para obtener mapas de mayor resolución. Para la mioglobina, donde se utilizaron 400 reflexiones para obtener un mapa de 6 Å, fueron necesarias 10 000 reflexiones para obtener un mapa de 2 Å y 17 000 para un mapa de una resolución extremadamente elevada de 1,4 Å. En la actualidad muchos de estos pasos están parcialmente automatizados mediante el uso de gráficos por ordenador. En la Figura 3.68 se muestra un corte bidimensional a través de un mapa de densidad electrónica tridimensional del tripsinógeno. La estructura primaria conocida de la proteína se ajusta al patrón de densidad electrónica mediante **refinamiento**, consistente en un proceso de cálculo intensivo para alinear la estructura primaria de una proteína con el mapa de densidad electrónica hasta obtener el mejor ajuste.

Aunque la difracción de rayos X ha proporcionado un extenso conocimiento sobre la estructura proteica, esta estructura proporciona datos incompletos sobre el mecanismo de acción de una proteína. La estructura determinada por rayos X es una estructura promedio cuyos átomos están normalmente sujetos a rápidas fluctuaciones en disolución (véase la Sección 3.8). Por lo tanto, la estructura cristalina promedio determinada por difracción de rayos X puede no ser la estructura activa de una determinada proteína en disolución. Una segunda consideración importante es que nor-

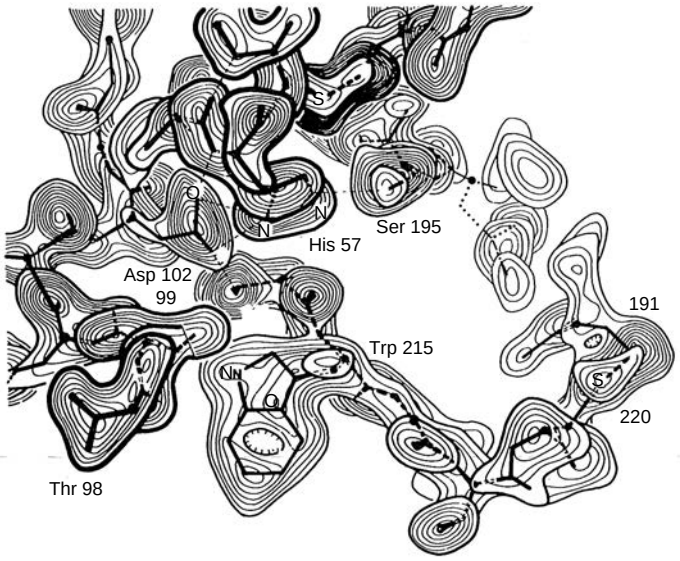


FIGURA 3.68
Mapa de densidad electrónica a 1,9 Å de resolución de la región del centro activo de la forma proenzimática de la tripsina.
Los residuos aminoácidos del centro activo están ajustados al mapa de densidad.
Reproducido con autorización de Kossiakoff, A. A., Chambers, J. L., Kay, L. M. y Stroud, R. M. Biochemistry *16:654, 1977. Copyright © 1977 por la American Chemical Society.*

malmente se requiere como mínimo un día para recoger los datos necesarios para la determinación de una estructura. En esta escala de tiempo no se observan las estructuras de los complejos reactivos enzima–sustrato, intermediarios y estados de transición de los enzimas. En su lugar, estas estructuras deben deducirse a partir de imágenes estáticas de una forma inactiva de la proteína o a partir de complejos con análogos inactivos de los sustratos de la proteína (Figura 3.69). Los métodos más recientes de difracción de rayos X, que utilizan radiación de sincrotrón para generar un haz de rayos X al menos 10 000 veces más intenso que el de los generadores de rayos X estándar, permiten recoger los datos de difracción para resolver una estructura proteica en una escala de tiempo de milisegundos. La aplicación de estas últimas técnicas de rayos X permitirá a los científicos determinar estructuras de vida corta y resolver problemas dinámicos y mecanísticos no abordables con la metodología estándar.

Métodos espectroscópicos para el análisis de la estructura y la función de las proteínas

Espectroscopia de luz ultravioleta

Las cadenas laterales de la tirosina, la fenilalanina y el triptófano, al igual que los enlaces peptídicos de las proteínas, absorben luz ultravioleta (UV). La eficiencia en la

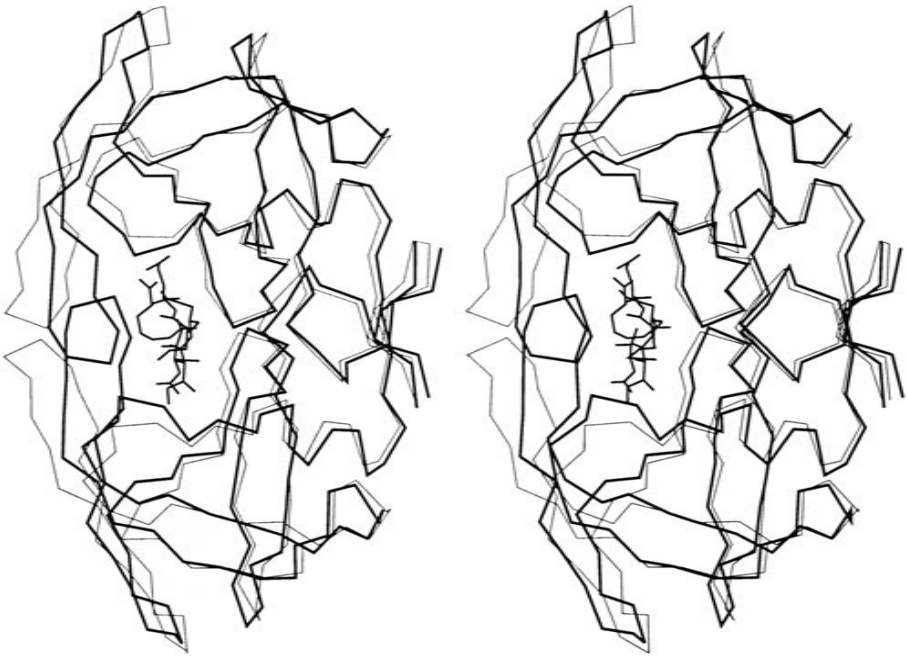


FIGURA 3.69
Representación estereoscópica del esqueleto de carbonos α de la proteasa del VIH con inhibidor unido (trazo grueso) y de la estructura nativa de la misma proteasa sin inhibidor (trazo delgado).
Adaptado con autorización de Miller, M., Schneider, J., Sathyanarayana, B. K., Toth, M. V., Marshall, G. R., Clawson, L., Selk, L., Kent, S. B. H. y Wlodawer, A. Science *246:1149, 1989. Copyright © 1989 by the American Association for the Advancement of Science.*

absorción de energía luminosa para cada **cromóforo** está relacionada con su **coeficiente de extinción molar** (ε). En la Figura 3.70 se muestra un espectro típico de una proteína. La absorbancia entre 260 y 300 nm se debe principalmente a los grupos de las cadenas laterales de la fenilalanina, la tirosina y el triptófano (Figura 3.71). Cuando se ioniza la cadena lateral de la tirosina a pH elevado (el grupo R de la tirosina tiene un $pK'_a \approx 10$), la absorbancia de la tirosina se desplaza a una longitud de onda más elevada (desplazamiento hacia el rojo), y aumenta su absorbancia (Figura 3.71). Los enlaces peptídicos absorben en el ultravioleta lejano (180–230 nm). Un enlace peptídico en configuración de hélice α interacciona con los electrones de otros enlaces peptídicos por encima y por debajo en la conformación espiral, creando un **sistema excitón** en el que los electrones están deslocalizados. El resultado es un desplazamiento del máximo de absorción de un enlace peptídico aislado hacia una longitud de onda más baja o más elevada (Figura 3.72). Por lo tanto, la espectroscopia ultravioleta puede utilizarse para estudiar cambios en la estructura secundaria o terciaria de las proteínas. A medida que una proteína se desnaturaliza (hélices desplegadas), se observan diferencias en las características de absorción de los enlaces peptídicos, debido a la disrupción del sistema excitón. Además, el máximo de absorción de los cromóforos aromáticos aparece a una longitud de onda menor en un entorno acuoso que en un entorno no polar.

La **absorbancia molar** de un sustrato cromofórico cambia frecuentemente cuando se une a una proteína. Este cambio en el coeficiente de extinción de la molécula que se une puede utilizarse para medir su constante de unión. Los cambios en los coeficientes de extinción de los cromóforos durante la catálisis enzimática de una reacción química se utilizan para obtener los parámetros cinéticos de la reacción.

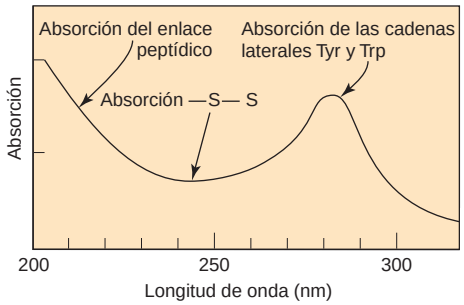


FIGURA 3.70
Espectro de absorción ultravioleta de la proteína globular α-quimotripsina.

Espectroscopia de fluorescencia

La energía de un electrón excitado por absorción de luz se pierde mediante varios mecanismos y, muy frecuentemente, en forma de energía térmica en un proceso de colisión. En algunos cromóforos, la energía de excitación se disipa por fluorescencia. La **emisión fluorescente** es siempre de una longitud de onda superior (menor energía) que la longitud de onda de absorción del fluoróforo. Los niveles de energía vibracional superiores, formados en el estado de electrón excitado durante la excitación, se pierden antes de que tenga lugar la emisión de fluorescencia (Figura 3.73). Si está presente un cromóforo que absorbe la energía luminosa emitida por el **fluoróforo**, la fluorescencia emitida no se observa. En su lugar, la energía de la fluorescencia se transfiere a la molécula que absorbe. A su vez, la **molécula aceptora** o bien emite su propia fluorescencia característica, o bien pierde su energía de excitación mediante un proceso alternativo. Si la molécula aceptora pierde su energía de excitación mediante un proceso no fluorescente, está actuando como un **extintor** de la fluorescencia de la **molécula dadora**. La eficiencia de la **transferencia de excitación** depende de la distancia y la orientación entre las moléculas dadora y aceptora.

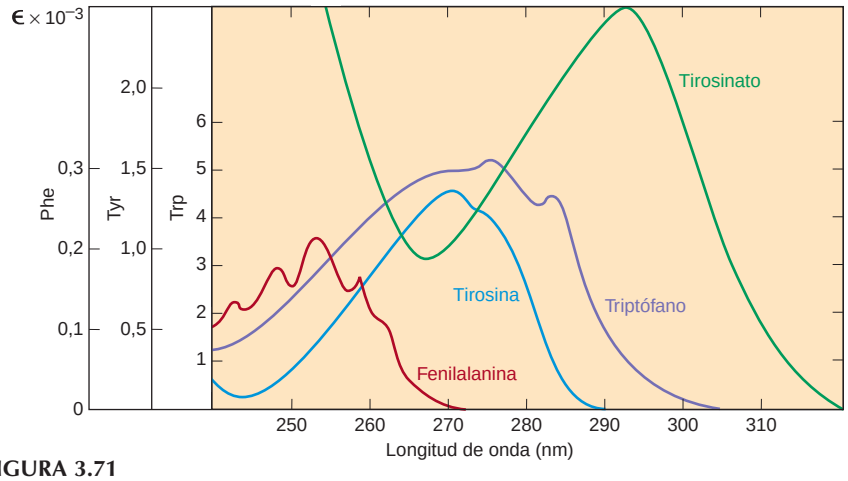


FIGURA 3.71
Absorción ultravioleta de los cromóforos aromáticos de la Phe, Tyr, Trp y tirosinato. Obsérvense las diferencias en los coeficientes de extinción en el eje de ordenadas para los diferentes cromóforos.
Adaptado de d'Albis, A. y Gratzer, W. B. En: A. T. Bull, J. R. Lagmado, J. O. Thomas y K. F. Tipton (Eds.), Companion to Biochemistry. *London: Longmans, 1974, p. 170.*

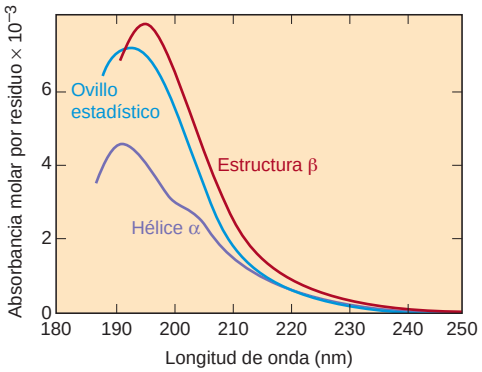


FIGURA 3.72
Absorción ultravioleta de los enlaces peptídicos de una cadena polipeptídica en las conformaciones de hélice α, ovillo estadístico y estructura β antiparalela.
Adaptado de d'Albis, A. y Gratzer, W. B. En: A. T. Bull, J. R. Lagmado, J. O. Thomas y K. F. Tipton (Eds.), Companion to Biochemistry. *London: Longmans, 1970, p. 175.*

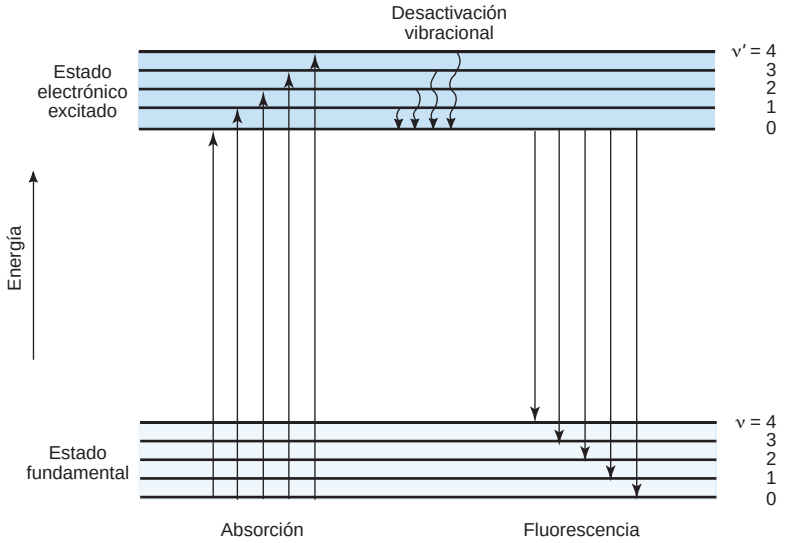


FIGURA 3.73
Transiciones electrónicas de absorción y fluorescencia. La excitación transcurre desde el nivel vibracional cero en el estado fundamental a varios niveles vibracionales más elevados en el estado excitado. La fluorescencia va desde el nivel vibracional cero en el estado electrónico excitado a varios niveles vibracionales en el estado fundamental.
Adaptado de d'Albis, A. y Gratzer, W. B. En: A. T. Bull, J. R. Lagmado, J. O. Thomas y K. F. Tipton (Eds.), Companion to Biochemistry. *London: Longmans, 1970, p. 166.*

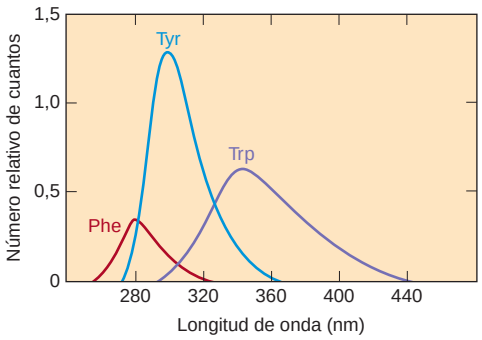


FIGURA 3.74
Fluorescencia característica de los grupos aromáticos de las proteínas.
Adaptado de d'Albis, A. y Gratzer, W. B. En: A. T. Bull, J. R. Lagmado, J. O. Thomas y K. F. Tipton (Eds.), Companion to Biochemistry. *London: Longmans, 1970, p. 478.*

En la Figura 3.74 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de las cadenas laterales de la fenilalanina, tirosina y triptófano. Las longitudes de onda de emisión de la fenilalanina se solapan con las longitudes de onda de absorción de la tirosina. A su vez, las longitudes de onda de emisión de la tirosina se solapan con las longitudes de onda de absorción del triptófano. Debido al solapamiento de las longitudes de onda de emisión y absorción, en las proteínas que contienen los tres tipos de aminoácidos generalmente sólo se observa la fluorescencia del triptófano. Las **transferencias de energía de excitación** se dan sobre distancias de hasta 80 Å, que son las distancias típicas de los diámetros de las proteínas globulares plegadas. Cuando se desnaturaliza una proteína, las distancias entre grupos dadores y aceptores se hacen mayores, y la eficiencia de la transferencia de energía al triptófano disminuye. Por consiguiente, con la desnaturalización de una proteína se observa un incremento de la fluorescencia debido a las tirosinas y/o fenilalaninas. Ya que los procesos de transferencia de excitación en las proteínas dependen de la distancia y de la orientación, la emisión de fluorescencia depende de la conformación de la proteína. Esta técnica ofrece su mayor sensibilidad en la detección de cambios debidos al disolvente o a interacciones de unión, más que en la determinación de la estructura absoluta.

Espectroscopia de dispersión rotatoria óptica y dicroísmo circular

La **rotación óptica** se produce por diferencias en el índice de refracción y el **dicroísmo circular** (CD) se origina por diferencias de absorción entre los componentes vectoriales dextrógiro y levógiro de un haz de luz polarizada a medida que atraviesa una disolución que contenga una molécula ópticamente activa, tal como un L-aminoácido. En las proteínas, los aminoácidos aromáticos y la cadena polipeptídica producen una rotación óptica y un espectro de CD (Figura 3.75). Debido a las diferencias entre los espectros de las hélices α, las estructuras β y los polipéptidos desordenados, el dicroísmo circular constituye un método sensible para determinar la cantidad y el tipo de estructura secundaria de una proteína. Los avances recientes en el dicroísmo circular vibracional examinan el CD en las regiones del espectro más sensibles a la conformación del esqueleto de las proteínas.

Resonancia magnética nuclear

Mediante **RMN bidimensional (2D)** y potentes espectrómetros de RMN, es posible obtener la conformación en disolución de proteínas pequeñas de hasta unos 150 aminoácidos. La RMN multidimensional y la triple resonancia pueden ampliar la capacidad de la RMN para llegar a resolver estructuras proteicas de hasta 250 aminoácidos.

Las técnicas de RMN convencionales requieren la utilización de radiación de radiofrecuencias (rf) para estudiar el entorno de núcleos atómicos que son magnéticos. Es imprescindible que los núcleos sean magnéticos, ya que la técnica se basa en el estado de espín desapareado de los núcleos. Así, el carbono (^{12}C), el nitrógeno (^{14}N)

y el oxígeno (^{16}O), abundantes en la naturaleza, no absorben, mientras que el ^{13}C, ^{15}N y el ^{17}O sí lo hacen. Las bandas de absorción de un espectro de RMN se caracterizan por: (1) la posición o valor del desplazamiento químico, representado como la diferencia entre la frecuencia observada para una banda de absorción específica y la observada para un material de referencia; (2) la intensidad del pico o del área integrada, que es proporcional al número total de núcleos que absorben; (3) la anchura del punto medio del pico, que refleja el grado del movimiento en disolución de las especies que absorben; y (4) la constante de acoplamiento, que mide la magnitud de la interacción directa o de la influencia de los núcleos vecinos sobre los núcleos que absorben. Estos cuatro parámetros permiten determinar la identidad y el número de los grupos vecinos más próximos que, a través de interacciones de enlace, pueden afectar a la respuesta de las especies que absorben. No dan información acerca de las interacciones a través del espacio (no enlazantes) debidas a la estructura tridimensional de la proteína. Para determinar las interacciones a través del espacio y la estructura terciaria de la proteína se requiere la utilización de los **efectos nucleares Overhauser (NOE)** y la aplicación de métodos bidimensionales.

La principal diferencia entre RMN unidimensional (1D) y bidimensional radica en la adición de un segundo pulso de rf retardado en el tiempo. La técnica requiere en primer lugar la identificación en el espectro de una absorbancia de protón correspondiente a una determinada posición en la estructura proteica. El límite para poder observar estas interacciones a través del espacio es una distancia máxima de unos 5 Å. La información acerca de las distancias entre parejas de residuos en la estructura de la proteína permite obtener conformaciones proteicas tridimensionales compatibles con los espectros. Para estos cálculos, se construye una matriz de distancias que contenga intervalos de distancias (mínima y máxima) de todas las interacciones que se hayan podido medir entre residuos de aminoácidos. Las posibles estructuras se generan a partir de los datos compatibles con las restricciones impuestas por los espectros de RMN. Para optimizar las distancias de los enlaces covalentes y de los ángulos de enlace, puede llevarse a cabo el refinamiento de las estructuras inicialmente calculadas. El método da lugar a una familia de estructuras, cuya variabilidad muestra tanto la falta de precisión de la técnica como el "desorden" dinámico de la estructura plegada (véase la Figura 3.76). Estos cálculos basados en experimentos de RMN han dado lugar a estructuras proteicas que no difieren significativamente de las estructuras promediadas en tiempo observadas con los métodos de difracción de rayos X.

Otras mejoras de la RMN aplicables a la determinación de estructuras proteicas incluyen la posibilidad de sintetizar proteínas que contengan aminoácidos enriquecidos isotópicamente (p. ej., ^{13}C y ^{15}N), y el desarrollo de reactivos de desplazamiento paramagnético, tales como los grupos de iones lantánidos, para el estudio de microentornos en las resonancias paramagnéticas.

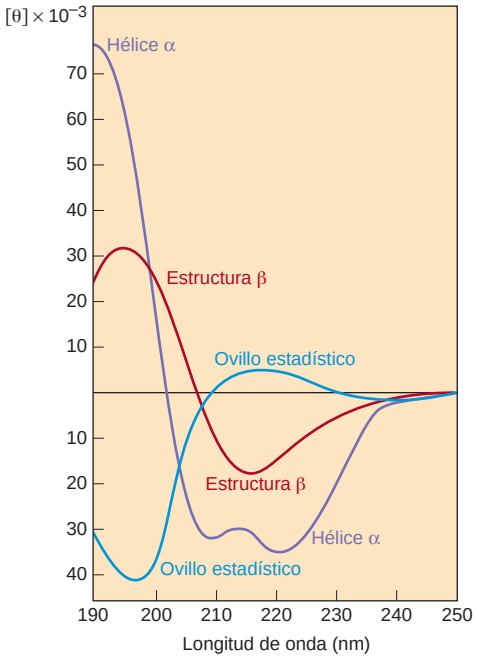


FIGURA 3.75
Espectros de dicroísmo circular de cadenas polipeptídicas en las conformaciones de hélice α, estructura β y ovillo estadístico.
Adaptado de d'Albis, A. y Gratzer, W. B. En: A. T. Bull, J. R. Lagmado, J. O. Thomas y K. F. Tipton (Eds.), Companion to Biochemistry. *London: Longmans, 1970, p. 190.*

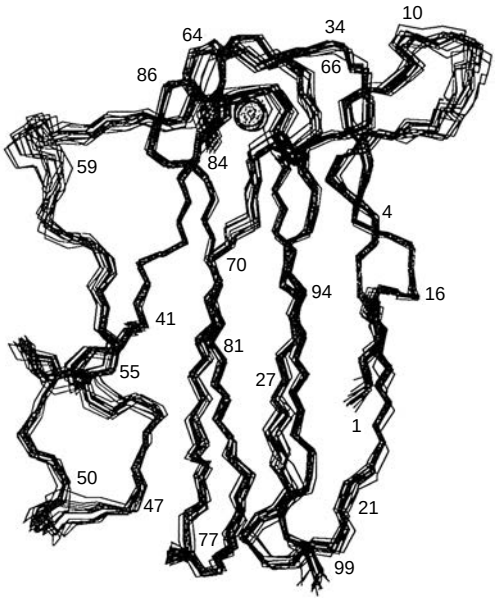


FIGURA 3.76
Estructura por RMN de la proteína plastocianina de alubia.
El dibujo muestra la superposición de ocho estructuras del esqueleto polipeptídico de la proteína, calculadas a partir del espectro de RMN.
De Moore, J. M., Lepre, C. A., Gippert, G. P., Chazin, W. J., Case, D. A. y Wright, P. E. J. Mol. Biol. 221:533, 1991. Figura cedida gentilmente por P. E. Wright.

BIBLIOGRAFÍA

Portales de programas de bioinformática y proteómica

http://www3.ncbi.nlm.gov/Entrez/ Sitio Entrez de los National Institutes of Health para acceder a las bases de datos de proteínas y al Protein Data Bank de estructuras tridimensionales de proteínas. Contiene la aplicación Cn3D para la visualización de las estructuras proteicas.

http://www.expasy.ch/tools/ El sitio ExPASy (Sistema experto de análisis de proteínas) de proteómica del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) contiene herramientas para el estudio de las proteínas y enlaces con otros sitios y bases de datos para el estudio y análisis de proteínas.

http://www.sdsc.edu/restools/ Un compendio de aplicaciones electrónicas y de herramientas accesibles en Internet.

http://www.archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html Base de datos de mutaciones en genes humanos. Colección de datos sobre mutaciones en proteínas humanas.

http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath. Clasificación estructural de la proteínas.

http://www.usm.maine.edu/~rhodes/SPVTut/index.html/ Guía de uso del visualizador Swiss PDB por Gale Rhodes, Universidad de South Maine. El visualizador Swiss PDB permite representar estructuras moleculares obtenidas en el Protein Data Bank. El Swiss PDB puede obtenerse en el sitio ExPASy. Se trata de un visualizador alternativo al Cn3D accesible en el sitio Entrez.

http://www.umass.edu/microbio/chime/explorer/index.htm/ Un tercer tipo de visualizador de estructuras de proteínas denominado explorador de proteínas. Este sitio también contiene enlaces con otros sitios de proteínas interesantes.

Portales comerciales (de libre acceso)

http://www.bionavigator.com/ Alicaciones bioinformáticas y herramientas para el análisis de proteínas.

http://www.doubletwist.com/ Herramientas bioinformáticas y acceso a bases de datos.

Propiedades físicas y estructurales de las proteínas

Bryson, J. W., Betz, S. F., Lu, H. S. Suich, D. H., Zhou, H. X., O'Neil, K. T. y DeGrado, W. F. Protein design: a hierarchic approach. *Science* 270:935, 1995.

Chothia, C. Principles that determine the structure of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 53:537, 1984.

Doolittle, R. F. The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 64:287, 1995.

Eisenberg, D. y McLachlan, A. D. Solvation energy in protein folding and binding. *Nature* 319:199, 1986.

Fasman, G. D. Protein conformational prediction. *Trends Biochem. Sci.* 14:295, 1989.

Finkelstein, A. V., Gutun, A. M. y Badretdinov, A. Ya. Why are the same protein folds used to perform different functions? *FEBS Lett.* 325:23, 1993.

Orengo, C. A., Jones, D. T. y Thornton, J. M. Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* 372:631, 1994.

Richardson, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34:168, 1981.

Rose, G. D. y Wolfenden, R. Hydrogen bonding, hydrophobicity, packing, and protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:381, 1993.

Srinivasan, R. y Rose, G.D. A physical basis for protein secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14258, 1999.

Plegamiento de proteínas

Anfinsen, C. B. y Scheraga, H. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Protein Chem.* 29:205, 1975.

Baldwin, R. L. y Rose, G.D. Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci.* 24:26, 1999.

Baldwin, R. L. y Rose, G.D. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem. Sci.* 24:77, 1999.

Bukau, B. y Horwich, A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351, 1998.

Bychkova, V. E. y Ptitsyn, O. B. The molten globule state is involved in genetic disease? *FEBS Lett.* 359:6, 1995.

Chen, S., Roseman, A. M., Hunter, A. S., Wood, S. P. Burston, S. G., Ranson, N. A., Clarke, A. R. y Saibil, H. R. Location of a folding protein and shape changes in GroEL–GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature* 371:261, 1994.

Dinner, A.R., Sali, A., Smith, L.J., Dobson, C.M. y Karplus, M. Understanding proteins folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem. Sci.* 25:331, 2000.

Dobson, C. M., Evans, P. A. y Radford, S. E. Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far. *Trends Biochem. Sci.* 19:31, 1994.

Feltham, J.L. y Gierasch, L.M. GroEL-substrate interactions: molding the fold, or folding the mold? *Cell* 100:193, 2000.

Jaenicke, R. Protein folding: local structures, domains, subunits and assemblies. *Biochemistry* 30:3147, 1991.

Lins, L. y Brasseur, R. The hydrophobic effect in protein folding. *FASEB J.* 9:535, 1995.

Ptitsyn, O. B. How the molten globule became. *Trends Biochem. Sci.* 20:376, 1995.

Shakhnovich, E., Abkevich, V. y Ptitsyn, O. Conserved residues and the mechanism of protein folding. *Nature* 379:96, 1996.

Wolynes, P. G., Onuchic, J. N. y Thirumalai, D. Navigating the folding routes. *Science* 267:1619, 1995.

Proteómica y Bioinformática

Eisenberg, D., Marcotte, E.M., Xenarios, I. y Yeates, T.O. Protein function in the postgenomic era. *Nature* 405:823, 2000.

Pandey, A. y Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837, 2000.

Técnicas para el estudio de proteínas

Bax, A. y Grzesiek, S. Methodological advances in protein NMR. *Acc. Chem. Res.* 26:131, 1993.

Reif, O. W., Lausch, R. y Fritag, R. High-performance capillary electrophoresis of human serum and plasma proteins. *Adv. Chromatogr.* 34:1, 1994.

Rhodes, G. *Crystallography Made Crystal Clear*, 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, 2000.

Dinámica de proteínas plegadas

Daggett, V. y Levitt, M. Realistic simulations of native-protein dynamics in solution and beyond. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:353, 1993.

Joseph, D., Petsko, G. A. y Karplus, M. Anatomy of a conformational change: hinged lid motion of the triosephophate isomerase loop. *Science* 249:1425, 1990.

Karplus, M. y McCammon, J. A. Dynamics of proteins: elements and function. *Ann. Rev. Biochem.* 53:263, 1983.

Karplus, M. y McCammon, J. A. The dynamics of proteins. *Sci. Am.* 254:42, 1986.

Glucoproteínas

Brockhausen, I. Clinical aspects of glycoprotein biosynthesis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 30:65, 1993.

Drickamer, K. y Taylor, M.E. Evolving views of protein glycosilation. Trends Biochem. Sci. 23:321, 1998.

Lis, H. y Sharon, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* 218:1, 1993.

Paulson, J. C. Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.* 14:272, 1989.

Lipoproteínas

Gotto, A. M., Jr. (Ed.), Plasma Lipoproteins. En: A. Neuberger y L. L. M. van Deenen (Eds.), *New Comprehensive Biochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1987.

Myers, G. L., Cooper, G. R. y Sampson, E. J. Traditional lipoprotein profile: clinical utility, performance requirement, and standardization. *Atherosclerosis* 108:S157, 1994.

Schumaker, V. N., Phillips, M. L. y Chatterton, J. E. Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. *Adv. Protein Chem.* 45: 205, 1994.

Segrest, J. P., Garber, D. W., Brouillette, C. G., Harvey, S. C. y Anantharamaiah, G. M. The amphipathic a helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv. Protein Chem.* 45:303, 1994.

Colágeno

Brodsky, B. y Shah, N. K. The triple-helix motif in proteins. *FASEB J.* 9:1537, 1995.

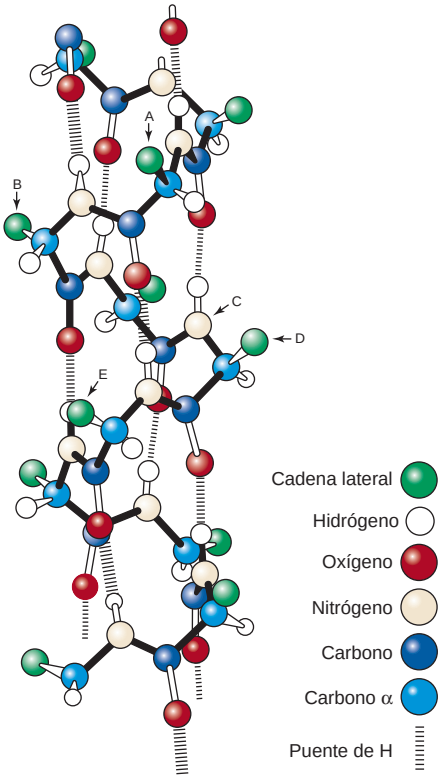
Kuivaniemi, H., Tromp, G. y Prockop, D. J. Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J.* 5:2052, 1991.

Prockop, D. J. y Kivirikko, K. I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 64:403, 1995.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

Las preguntas 1 y 2 hacen referencia a la siguiente estructura.



1. Cuando el grupo E contiene una función carboxílica cargada, la estructura es desestabilizada por:
   A. alanina en la posición A.
   B. arginina en la posición B.
   C. serina en la posición B.
   D. prolina en la posición D.
   E. aspartato en la posición D.

2. ¿Para qué fuerza estabilizadora de la estructura son esenciales las propiedades del átomo C?
   A. enlace de hidrógeno.
   B. efectos estéricos.
   C. atracción iónica.
   D. puente disulfuro.
   E. ninguno de los anteriores.

Tenga en cuenta los siguientes enunciados para las preguntas 3 y 4:

   A. formación de puentes disulfuro.
   B. enlaces de hidrógeno.
   C. interacción hidrofóbica.
   D. interacciones electrostáticas.
   E. fuerzas de van der Waals.

3. ¿Qué interacción NO se forma cuando subunidades proteicas se combinan para formar una estructura cuaternaria?
4. ¿Cuál es impulsada por la entropía del agua?

5. En el colágeno:
   A. los puentes de hidrógeno intracatenarios estabilizan la estructura nativa.
   B. tres cadenas con la conformación helicoidal de la poliprolina tipo II pueden enrollarse unas alrededor de las otras para formar una superhélice gracias a la estructura de la glicina.
   C. los ángulos ϕ de la prolina tienen libertad de rotación, pero los ángulos ψ están limitados por el anillo.
   D. las regiones superhelicoidales abarcan toda la estructura excepto los extremos N- y C-terminal.
   E. se forman entrecruzamientos entre las triple hélices después que un enzima intracelular convierta algunas de las lisinas en al-lisina.

6. Las proteínas chaperona:
   A. todas requieren ATP para ejercer su efecto.
   B. rompen puentes disulfuro incorrectos, permitiendo que los correctos se formen posteriormente.
   C. favorecen patrones de plegamiento de las cadenas polipeptídicas que serían termodinámicamente inestables sin la presencia de chaperonas.
   D. las de la clase hsp70 están implicadas en el transporte de proteínas a través de las membranas de las mitocondrias y del retículo endoplasmático.
   E. actúan solamente sobre cadenas polipeptídicas completamente sintetizadas, desplegando las estructuras incorrectas para que puedan plegarse correctamente.

7. Las proteínas pueden separarse por tamaño mediante:
   A. enfoque isoeléctrico.
   B. electroforesis en gel de poliacrilamida
   C. cromatografía de intercambio iónico.
   D. cromatografía de exclusión molecular.
   E. HPLC de fase inversa.

8. Los cambios de conformación de las proteínas pueden detectarse rápidamente por:
   A. espectroscopia de absorción ultravioleta.
   B. espectroscopia de emisión de fluorescencia.
   C. dispersión rotatoria óptica.
   D. dicroísmo circular.
   E. todos los mencionados.

9. Todas las partículas de lipoproteína de la sangre tienen la misma arquitectura general, que incluye:
   A. un núcleo neutro de triacilgliceroles y ésteres de colesterol.

B. lípidos anfipáticos con sus grupos polares orientados hacia la superficie y sus cadenas hidrofóbicas orientadas hacia el núcleo.
C. la mayoría de las apolipoproteínas de superficie contienen hélices anfipáticas.
D. colesterol no esterificado asociado con la envuelta externa.
E. todos los anteriores.

10. Las glucoproteínas
A. se encuentran en las células pero no en el plasma.
B. si se encuentran en la membrana plasmática, tienen el azúcar en el lado citosólico.
C. pueden tener el azúcar unido covalentemente a la proteína a través de un residuo de asparagina.
D. que tienen el azúcar unido a un grupo hidroxilo de la proteína siempre están unidos a la hidroxilisina.
E. de un tipo determinado siempre tienen las mismas cadenas azucaradas.

Preguntas 11 y 12: Se han descubierto más de 300 variantes de la hemoglobina humana; alrededor del 95% de ellas resultan de la sustitución de un solo aminoácido. Muchas no tienen manifestaciones clínicas, mientras que otras causan serios trastornos. Una de las variantes mejor estudiadas es la HbS, que causa la anemia falciforme. En la HbS, el glutamato en la sexta posición de la cadena β de la HbA (la hemoglobina adulta normal) está sustituido por valina. Esta sustitución provoca que la HbS, en su forma desoxi, polimerice con otras moléculas de HbS. Como consecuencia, los glóbulos rojos adquieren forma de hoz, que da lugar a la obstrucción de los capilares. Otras variantes de la hemoglobina son la Hiroshima (His 146 → Asp), la Riverdale-Bronx (Gly24 → Asp) y la $M_{Hyde\ Park}$ (His 92 → Tyr).

11. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones es correcta?
A. la sustitución en HbS es conservadora.
B. las cuatro hemoglobinas tienen sustituciones no conservadoras.
C. la HbS tiene una sustitución no conservadora pero las otras tres tienen sustituciones conservadoras.
D. la sustitución de $M_{Hyde\ Park}$ no es probable que cause un cambio de estructura.
E. todas las sustituciones de aminoácidos en las proteínas causan cambios en la función.

12. La HbS polimeriza con otras moléculas porque:
A. la estructura se modifica para ocultar la valina en el interior de la proteína.
B. el extremo C-terminal de la cadena se ha modificado.
C. se ha introducido una carga positiva en la superficie que atrae cargas negativas de otras moléculas.
D. la introducción de un grupo hidrofóbico en la superficie atrae otros grupos hidrofóbicos de otras moléculas de HbS.
E. la valina tiene una fuerte tendencia a formar puentes de hidrógeno.

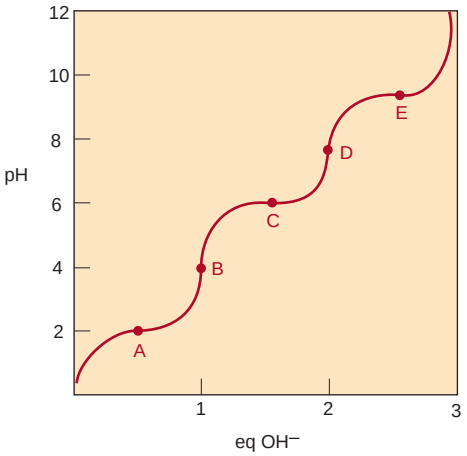
Preguntas 13 y 14: Hay varias situaciones patológicas conocidas como hiperlipidemias que son el resultado de velocidades anómalas de síntesis o de eliminación de las lipoproteínas de la sangre. Generalmente se caracterizan por niveles elevados de colesterol y/o triacilgliceroles en la sangre. El tipo I se caracteriza por niveles plasmáticos muy altos de triacilgliceroles (>1000 g dL^{-1}) a causa de una acumulación de quilomicrones. El tipo II (también conocido como hipercolesterolemia familiar) se caracteriza por colesterol elevado, especialmente en forma de LDL. Otra anomalía de las lipoproteínas es la hipolipoproteinemia en la cual no se forman lipoproteínas a causa la incapacidad de formar un apoproteína en particular.

13. Si se centrifugara el suero de un paciente con hiperlipidemia de tipo I, la banda de lípidos se encontraría en:
A. en la parte superior del tubo.
B. justo debajo de la parte superior del tubo.
C. por debajo de la parte superior pero todavía en la mitad superior del tubo.
D. hacia la mitad del tubo.
E. cerca de la base del tubo.

14. La Abetalipoproteinemia es una enfermedad caracterizada por la carencia de quilomicrones, VLDL y LDL en la sangre. Teniendo en cuenta que está presente en concentraciones significativas (>20%) en los tres tipos de partículas, ¿cuál es la proteína que falta?:
A. ApoA-I.
B. ApoB-100.
C. ApoC-II.
D. ApoD.
E. ApoE.

Problemas

15. La figura muestra la curva de valoración de un aminoácido común. ¿De qué aminoácido se trata? ¿Qué punto de la curva representa el p*I* (punto isoeléctrico) del aminoácido?



16. Después de la correspondiente purificación se utilizó la degradación de Edman para secuenciar un dodecapéptido. Se obtuvieron los siguientes datos. El aminoácido C-terminal es isoleucina; el aminoácido N-terminal es metionina; los fragmentos peptídicos son Ala-Ala-Ile, Leu-Arg-Lys-Lys-Glu-Lys-Glu-Ala, Met-Gly-Leu y Met-Phe-Pro-Met. ¿Cuál es la secuencia del péptido?

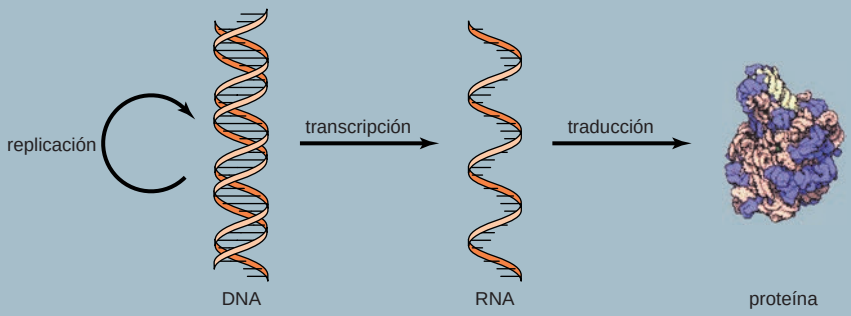
RESPUESTAS

1. **D** La prolina desestabiliza la conformación en hélice α y normalmente no se encuentra en las hélices α. A: La alanina tiene una cadena lateral pequeña. B: La arginina es neutra y no debería desestabilizar la hélice. E: Cambios equivalentes en la tercera o cuarta posición en ambas direcciones desde la posición designada son desestabilizadoras debido a la repulsión de cargas. Por lo tanto, el aspartato en la posición D es inocuo, mientras que el glutamato en posición A o B sería desestabilizador.

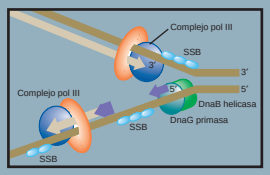
2. **A** El átomo C es un nitrógeno amida. El átomo de hidrógeno unido participa en un puente de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno contribuyen a la estabilidad de la estructura.
3. **A** La estructura cuaternaria está estabilizada exclusivamente por interacciones no covalentes. Los puentes disulfuro son covalentes.
4 **C** Los grupos hidrofóbicos en contacto con el agua inducen la formación de una capa de solvatación de moléculas de agua altamente ordenadas. Si los grupos hidrofóbicos se ponen en contacto, eliminando el agua ligada, el agua incrementa su desorden, lo cual es termodinámicamente favorable.
5 **B** Los contactos en el interior de la triple hélice sólo son posibles cuando el grupo R del aminoácido en esta posición es muy pequeño, es decir, un hidrógeno. A: Los puentes de hidrógeno del colágeno son intercatenarios. C: El ángulo ϕ forma parte del anillo de la prolina y no tiene libertad de rotación. D: Aunque la afirmación es aplicable al colágeno de tipo I, las regiones superhelicoidales de otros tipos de colágeno pueden estar interrumpidas por dominios globulares. E: La conversión y el entrecruzamiento son extracelulares.
6. **D** Las proteínas cruzan la membrana en forma desplegada y vuelven a plegarse una vez que han cruzado la membrana. A: La familia de chaperonas hsp60 utiliza ATP, pero la familia hsp70 no. B: Esta reacción está catalizada por las disulfuro isomerasas. C: El producto final es termodinámicamente estable; las chaperonas simplemente impiden las interacciones intermedias desfavorables. E: Las chaperonas hsp70 se unen a los polipéptidos nacientes a medida que son sintetizados en el ribosoma. La proteína puede ser transferida a continuación a la chaperona hsp60 para facilitar el plegamiento final.
7. **D** Otro método que separa por tamaño es la PAGE SDS. A–C separan la moléculas por carga. E: La HPLC de fase inversa separa por polaridad.
8. **E** A: La absorción del enlace peptídico (180-230 nm) en la conformación de hélice α difiere de la de otras conformaciones. B: La transferencia de excitación se hace menos eficiente a medida que los grupos dador y aceptor se alejan uno de otro, como en la desnaturalización. C, D: Los efectos de la luz polarizada sobre cromóforos ópticamente activos son sensibles al entorno; además, el propio enlace peptídico entra a formar parte de un sistema ópticamente activo cuando forma una estructura asimétrica como la hélice α.
9. **E** Todas las lipoproteínas comparten estas características. C: La cara polar interacciona con el agua y la cara hidrofóbica está orientada hacia el núcleo. D: El grupo hidroxilo del colesterol es suficientemente polar para orientarse hacia la cubierta externa.
10. **C** Es un enlace N-glucosídico y la asparagina debe encontrarse en la secuencia Asn-X-Thr(Ser). A: La mayor parte de las proteínas plasmáticas, excepto la albúmina, son glucoproteínas (por ejemplo, los determinantes de la sangre y las inmunoglobulinas). B: los azúcares se encuentran en el exterior de la célula porque sus funciones principales son el reconocimiento intercelular y la formación de receptores celulares que unen proteínas extracelulares. D: Este enlace se encuentra sólo en el colágeno. Otros azúcares están unidos a la serina o a la treonina por enlaces O-glucosídicos. E: La estructura del azúcar no está controlada por genes y es variable.
11. **B** Una sustitución no conservadora es aquella que comporta un cambio de polaridad significativo. A: Un cambio de carga negativa a grupo hidrofóbico es claramente no conservador. C: Hiroshima es de positivo a negativo, Riverdale-Bronx es de ligeramente hidrofóbico a positivo y Hyde Park es de positivo a muy hidrofóbico. D: Se ha demostrado que esta mutación provoca la pérdida del enlace del ligando al hierro hemo y la pérdida del hemo del sitio de unión del hemo en la cadena beta. E: Los cambios de función dependen de muchos factores, atendiendo a si la sustitución cambia la estructura o si se encuentra en una posición crítica. Todas las variantes mencionadas en este problema son patológicas.
12. **D** A veces se han denominado "extremos adhesivos", porque la valina es muy hidrofóbica y atrae a otros grupos hidrofóbicos. A: la posición original del glutamato es en el exterior y ahí es donde permanece la valina. B: Las cadenas se numeran a partir del N-terminal, por tanto la posición 6 está cerca del N-terminal. C: No hay carga positiva: E: La valina no puede formar puentes de hidrógeno.
13. **A** Los quilomicrones tienen una densidad menor que el agua, por lo tanto flotan en la superficie. B: Las VLDL pueden encontrarse en esta posición. C: Esta banda sería de LDL: D: Probablemente ninguna lipoproteína se encuentre en esta posición. E: Las HDL se encuentran cerca de la base del tubo porque son las más densas.
14. **B** La ApoB-100 es la proteína reconocida por los receptores de LDL. Los quilomicrones contienen la cantidad menor, pero todavía es del 20%. A: Es la proteína principal de las HDL. C: La ApoC-II está presente en los tres tipos de partícula para activar a la lipoproteína lipasa, pero representa solamente el 2-15% de la proteína total. D: Sólo está presente en los quilomicrones y sólo representa un 1%. E: Se encuentra en los tres tipos de partícula en un porcentaje de sólo 5-20%.
15. Examine cuidadosamente las leyendas de los ejes en su análisis. Los puntos A, C y E representan los valores de p*K* de los tres grupos disociables, es decir, los puntos en los cuales cada uno de los grupos está titulado al 50%. Tienen valores de ~2, ~6 y ~9,5, por lo tanto el aminoácido tiene que ser la histidina. En el punto B la carga es $-1 + 1 + 1 = +1$. En D la carga es $-1 + 0 + 1 = 0$. El punto D tiene que ser el punto isoeléctrico.
16. Hay que conocer los aminoácidos N- y C-terminales y el número total de aminoácidos (12) del péptido. Con estos criterios y solapando los fragmentos puede obtenerse la secuencia: Met-Phe-Pro-Met-Gly-Leu-Arg-Lys-Glu-Ala-Ala-Ile. Observe que el fragmento Lys-Glu no aporta información adicional para la secuenciación.

PARTE II

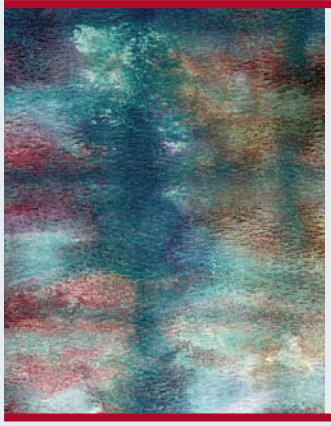
TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN



La trasmisión de información es un requerimiento absoluto de la vida celular. La información codificada en el DNA debe replicarse en otro DNA con un alto grado de fidelidad para ser transmitida a las células hijas. En el DNA está codificada la información para sintetizar las proteínas. La información se transcribe en varias formas de RNA. Una de ellas sirve de molde para traducir la información a la secuencia específica de aminoácidos de una proteína. Otras formas de RNA forman parte del mecanismo de la síntesis proteica. En los siguientes capítulos se describen los procesos de replicación, transcripción y traducción, cómo se controlan y cómo los humanos son capaces de manipular estos procesos para alterar la constitución genética de las células.



4



REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA

Howard J. Edenberg

4.1 CARACTERÍSTICAS COMUNES DE LA REPLICACIÓN, LA RECOBINACIÓN Y LA REPARACIÓN 162

4.2 REPLICACIÓN DEL DNA 162

Principios básicos 162
Química de la elongación de las hebras 163
Las DNA polimerasas 163
Movimiento de la horquilla de replicación 166
- El problema de la polaridad 166
- Cebado 166
- Síntesis 167
- Eliminación de los cebadores 167
- Relleno del hueco 167
- Ligación 168
- Separación de las hebras parentales 168
- Problemas topológicos del desenrollamiento de las hebras parentales 168
- Procesividad 172

Coreografía en tres dimensiones 172
Enzimas procarióticos 173
Enzimas eucarióticos 175
Orígenes de replicación 177
Proceso de iniciación 177
El ciclo celular 178
Terminación de la replicación en los genomas circulares 181
Terminación de la replicación en los genomas lineales 181
- Telomerasa 181

Replicación de los genomas de RNA 183
Secuenciación del DNA 184

4.3 RECOMBINACIÓN 186

El modelo de Holliday 186
El modelo de Meselson-Radding 188
El modelo del corte de doble cadena 189
Principales enzimas de la recombinación 190
- RecA 190
- Otras proteínas 190
- DNA-PK 190

Recombinación no homóloga 190
- Recombinación específica de sitio 190
- Transposición 190

Recombinación no homóloga (ilegítima) 191

4.4 REPARACIÓN 191

Lesiones del DNA 191
Mutaciones 192
Reparación por escisión 194
Reparación por escisión de base 194
Reparación por escisión de nucleótido 195
Acoplamiento de la reparación y la transcripción 196
Reparación de apareamientos incorrectos 197
Desmetilación enzimática 198
Fotorreactivación 199
Lesiones que pueden bloquear la replicación 200
Reparación de huecos en la hebra hija 200
Síntesis a través de la lesión 201
Reparación de roturas de cadena doble 202
Regulación de la reparación: El regulón SOS 202

BIBLIOGRAFÍA 204

PREGUNTAS 204

RESPUESTAS 206

APLICACIONES CLÍNICAS

4.1 Las topoisomerasas como dianas farmacológicas 175
4.2 El cáncer y el ciclo celular 180
4.3 Los análogos de los nucleósidos y la resistencia a los fármacos en la terapia contra el VIH 184
4.4 El Proyecto Genoma Humano 185
4.5 Medicina genómica 186
4.6 Terapia génica 191
4.7 Xeroderma pigmentoso 196
4.8 Reparación de apareamientos incorrectos y cáncer 198

4.1 CARACTERÍSTICAS COMUNES DE LA REPLICACIÓN, LA RECOMBINACIÓN Y LA REPARACIÓN

Al tratar de "las tres R" del DNA —replicación, recombinación y reparación— es conveniente tener presente sus aspectos comunes. Al actuar sobre el mismo sustrato, cadenas de DNA, comparten los mecanismos químicos básicos para la formación y la rotura de los enlaces fosfodiéster. La química del DNA consiste en buena parte en la química de los enlaces fosfodiéster. El ataque nucleofílico sobre un **enlace fosfodiéster** es un tema recurrente en los tres procesos. Otras características fundamentales del DNA que influyen sobre estos procesos son la estructura en doble hebra del DNA celular y la complementariedad de las dos hebras. Por lo tanto, hay dos copias de la información, y cada hebra puede servir de molde para la síntesis o la reparación de la otra cadena. La naturaleza antiparalela de las dos hebras es una característica esencial en todos los procesos que actúan sobre el DNA. La importancia de los procesos de replicación, recombinación y reparación en todas las células explica que sus mecanismos fundamentales estén conservados a lo largo de toda la evolución. Las similitudes entre la replicación, la recombinación y la reparación se manifiestan a menudo en el uso de un mismo enzima en los diferentes procesos. Sin embargo, los requerimientos de fidelidad y regulación a veces exigen la presencia de un grupo de enzimas especiales para una determinada tarea. La consideración de las semejanzas y las diferencias hace más fácil la comprensión de estos procesos.

Por su calidad de soporte de la información genética, el DNA celular tiene que ser duplicado, mantenido y transferido a las células hijas sin sufrir alteraciones. La magnitud del problema es considerable. La bacteria común *Escherichia coli* (***E. coli***) tiene un genoma de 4,6 millones de pares de bases (pb). Cada uno de los **cromosomas** humanos contiene una sola molécula de DNA; los tamaños oscilan entre 34 millones de pares de bases para el cromosoma más pequeño hasta 263 millones para el mayor. El genoma humano consiste en dos copias de 23 cromosomas, que totalizan aproximadamente 6×10^9 pb. La precisión de la replicación es extremadamente alta. En un ciclo de replicación se produce aproximadamente 1 error por cada mil millones de pares de bases. Pero incluso con esta extraordinaria precisión, se introducen unos cuantos errores en cada división celular. Ello produce mutaciones; es decir, cambios hereditarios de la secuencia del DNA. Las mutaciones son generalmente dañinas; pueden afectar la viabilidad celular o desencadenar el crecimiento incontrolado característico del cáncer. Hay situaciones en las cuales un solo cambio en los 6×10^9 pb del genoma humano puede causar una grave enfermedad. Los eucariotas tienen la exigencia adicional de asegurar que todas las partes del genoma se repliquen una sola vez en cada ciclo.

La exactitud de la replicación no es suficiente. El DNA celular está sujeto a continuas agresiones por agentes químicos y físicos, entre los que se encuentran el agua, especies de oxígeno activado, que son subproductos del metabolismo celular normal, productos químicos presentes en los alimentos o en el medio y la radiación. Hay mecanismos que reconocen y reparan las lesiones del DNA, y que ayudan así a mantener la integridad del genoma. A pesar de todas estas precauciones, la acumulación de mutaciones puede causar la muerte, el envejecimiento y el cáncer.

4.2 REPLICACIÓN DEL DNA

Principios básicos

La replicación duplica el DNA, respetando la información genética codificada en la secuencia de bases. La replicación requiere un **molde** que suministre la información de la secuencia. El mecanismo básico de la replicación del DNA resultó obvio nada más descubrirse la estructura complementaria en doble hélice del DNA por Watson y Crick en 1953. Gracias a la complementariedad de las hebras, con una A de una cadena apareada siempre con una T de la otra, del mismo modo para C y G, las dos hebras pueden separarse y cada una servir de molde para la síntesis de una nueva hebra complementaria. Este proceso se conoce como **replicación semiconservadora**,

FIGURA 4.1
Molde y cebador.
El sustrato para la adición de los nucleótidos es un cebador (color claro) unido al molde (color oscuro) por puentes de hidrógeno. El cebador suministra el grupo 3′ hidroxilo al cual se unen los nucleótidos. Las dos cadenas son antiparalelas.

porque la mitad de la molécula de DNA parental (una hebra) se conserva en cada una de las nuevas dobles hélices, apareada con la hebra complementaria recién sintetizada.

Sin embargo, para la síntesis de DNA con el molde no es suficiente. Las **DNA polimerasas**, los enzimas que catalizan la adición de mononucleótidos, requieren **cebadores**. Las DNA polimerasas, en lugar de unir los dos primeros nucleótidos para iniciar una cadena, añaden nucleótidos a un cebador ya existente que suministra el residuo 3′-hidroxilo (Figura 4.1, Tabla 4.1). La necesidad de un cebador no se debe a la química de formación del enlace fosfodiéster, como lo demuestra la capacidad de las **RNA polimerasas** para iniciar cadenas *de novo* (sin cebadores). Probablemente evolucionó para aumentar la precisión del proceso, pues probablemente la corrección de pruebas de los primeros nucleótidos no sería efectiva. El etiquetado de estos nucleótidos, mediante la síntesis de un cebador de RNA, permite su posterior identificación y eliminación, y finalmente un relleno más exacto del hueco.

Química de la elongación de las hebras

La química de replicación, reparación y recombinación del DNA es en buena parte la de los **enlaces fosfodiéster**, que unen los nucleótidos vecinos a lo largo de cada hebra de DNA. La Figura 4.2 muestra la formación de un enlace fosfodiéster entre una corta cadena de RNA (un **cebador**) y un nucleótido entrante. Este proceso se repite para cada nucleótido añadido durante el crecimiento de la hebra.

La adición de un mononucleótido a una hebra en crecimiento no es un proceso espontáneo, porque la disminución de entropía es considerable. Por esta razón los nucleótidos precursores del DNA son 5′-desoxirribonucleósidos trifosfatos (5′-dNTP). El enlace fosfodiéster que conecta el primer fosfato (α) (unido al carbono 5′ del azúcar) y los dos fosfatos más externos (β y γ) sufre un ataque nucleofílico por parte del 3′-OH de la hebra de DNA en crecimiento (Figura 4.2). El enlace no es hidrolizado, sino más bien **transesterificado**: el enlace fosfodiéster que unía el fosfato α con el fosfato β une ahora el carbono α con el extremo 3′ de la cadena en crecimiento. Los dos fosfatos terminales son liberados como pirofosfato inorgánico, que es hidrolizado por las pirofosfatasas celulares. La hidrólisis del pirofosfato convierte la reacción en prácticamente irreversible. Las reacciones de transesterificación son una parte importante de los procesos de replicación, reparación y recombinación.

Las DNA polimerasas

Las **DNA polimerasas** catalizan la adición de nucleótidos durante la elongación de las cadenas. Las DNA polimerasas requieren tanto moldes como cebadores y utilizan 5′-dNTP como precursores, como se muestra en la Figura 4.2. Las células poseen múltiples DNA polimerasas que desempeñan funciones especializadas (Tabla 4.2).

TABLA 4.1 Requerimientos de la replicación del DNA

Molde	Suministra la información de la secuencia
Cebador	Suministra el 3′-OH libre al cual se añaden los nucleótidos
Precursores	5′-Desoxirribonucleósidos trifosfato (5′-dNTP)
Enzimas	DNA polimerasas, abrazaderas deslizantes, helicasas, primasas, proteínas de unión a DNA de cadena sencilla, nucleasas, ligasas

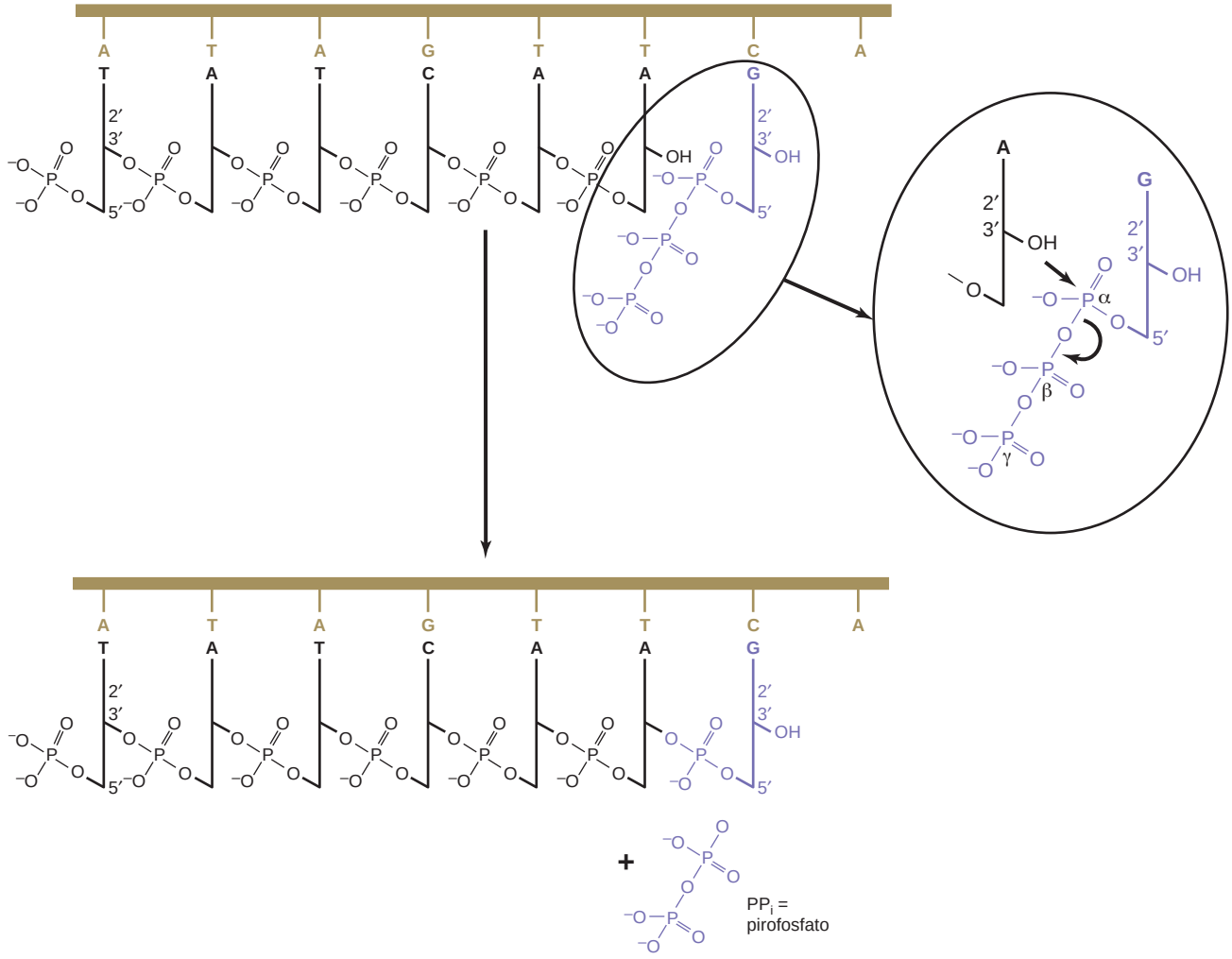


FIGURA 4.2
Formación de un enlace fosfodiéster.
En púrpura se muestra un nucleósido trifosfato entrante correctamente apareado por puentes de hidrógeno con el molde en el sitio activo de la DNA polimerasa. El 3′-OH del cebador ataca al fosfato más interno (α) del nucleótido, generando pirofosfato, como se muestra en el círculo. El resultado es la elongación del cebador en un nucleótido. Este ciclo se repite hasta el agotamiento del molde.

Las DNA polimerasas aseguran la fidelidad de dos maneras: seleccionando el nucleótido adecuado y mediante mecanismos enzimáticos de corrección de pruebas.

La selección inicial se basa en el encaje del nucleótido entrante en el centro activo del enzima. Un nucleótido entrante que establezca los puentes de hidrógeno correctos con la hebra molde puede ser añadido a la cadena en crecimiento. Un nucleótido entrante que no establezca los puentes de hidrógeno adecuados no queda orientado correctamente para la catálisis. Con ello se consigue una precisión del orden de 10^{-4}, que es buena para muchos procesos, pero claramente insuficiente para la replicación.

La segunda forma de aumentar la fidelidad es mediante una etapa de **corrección de pruebas**. Esta corre a cargo de una **actividad exonucleolítica** de 3′ a 5′ que elimina los nucleótidos mal apareados del extremo 3′ de la cadena. Esta actividad está presente en muchas DNA polimerasas replicativas, pero en algunos casos la desempeña una proteína asociada al complejo de replicación. Un cebador con un nucleótido terminal correctamente apareado es un buen sustrato para la adición del siguiente nucleótido y un mal sustrato par la 3′ a 5′ exonucleasa (Figura 4.3). Un cebador con un nucleótido terminal mal apareado es un mal sustrato para la adición de un nucleótido y un buen sustrato para la 3′ a 5′ exonucleasa. Esta combinación tiene como resultado la eliminación de prácticamente todos los nucleótidos mal apareados antes de que se añada otro nucleótido. También causa la eliminación de algunos nucleóti-

TABLA 4.2 DNA polimerasas

Enzima	*Función*
Escherichia coli	
Pol I	Completar los fragmentos de Okazaki, reparación del DNA
Pol II	Pasar por alto las lesiones, reparación del DNA
Pol III	Principal polimerasa replicativa
Pol IV	Pasar por alto las lesiones
Pol V	Pasar por alto las lesiones
Eucarióticos	
Pol α	Cebado de la replicación
Pol β	Reparación por escisión de base
Pol γ	Replicación del DNA mitocondrial
Pol δ	Principal polimerasa replicativa
Pol ε	(no definida, replicación y reparación)
Pol ξ	Pasar por alto las lesiones
Pol η	Pasar por alto las lesiones
Pol ι	Pasar por alto las lesiones

dos correctamente apareados, pero éste es un precio que hay que pagar por el aumento de fidelidad que proporciona la corrección de pruebas. La capacidad de discriminar entre nucleótidos correcta e incorrectamente incorporados se ve comprometida cuando la cadena que está siendo polimerizada es muy corta, porque la fuerza del apareamiento entre un cadena corta y el molde es débil. Esta es la explicación más probable para la evolución de DNA polimerasas incapaces de iniciar cadenas *de novo*.

La eficacia de la corrección de pruebas no experimentó un aumento sostenido a lo largo de la evolución. Algunas DNA polimerasas mutantes son más propensas a cometer errores y provocan una tasa de mutación mayor, pero otras DNA polimerasas mutadas cometen menos errores. Es una situación paradójica, considerando que una fidelidad mayor puede tener ventajas evolutivas. Sin embargo, hay razones para suponer que más allá de un cierto grado, una mayor fidelidad no es ventajosa. En primer lugar la corrección de pruebas extremadamente fiel es energéticamente costosa. Para asegurar que virtualmente todas las bases incorrectamente incorporadas sean eliminadas, una polimerasa también debe eliminar un gran número de bases correctamente incorporadas que se han movido ligeramente con relación al molde debido a fluctuaciones térmicas normales. Ello enlentecería la replicación y utilizaría energía adicional en forma de dNTP. Segundo, la capacidad de los sistemas de reparación de DNA para corregir errores residuales disminuye las ventajas de polimerasas aún más fieles. También se ha argumentado que un bajo ni-

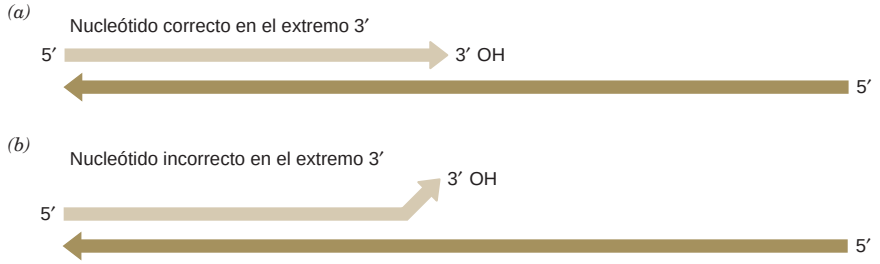


FIGURA 4.3
Corrección de pruebas.
(*a*) Cuando se añade al extremo 3′ del cebador un nucleótido que pueda aparearse correctamente con el molde, el resultado es un buen sustrato para la adición de un nucleótido pero un mal sustrato para la actividad de 3′ a 5′ exonucleasa. (*b*) En cambio, cuando se añade un nucleótido incorrecto el cebador resultante es un mal sustrato para la adición de un nucleótido pero un buen sustrato para la actividad exonucleasa de de 3′ a 5′ correctora de pruebas, que elimina el nucleótido desapareado, permitiendo así la introducción del nucleótido correcto aunque el cebador sea más corto.

vel de mutación suministra la materia prima de la evolución, al producir poblaciones con un cierto grado de variabilidad genética; estas poblaciones están mejor preparadas para sobrevivir a un cambio de condiciones.

A pesar de su gran fidelidad, las polimerasas pueden incorporar análogos de los nucleótidos. Estos análogos se usan a menudo en quimioterapia para suprimir células cancerosas en rápido crecimiento o virus. Los análogos que se convierten en nucleótidos por fosforilación pueden incorporarse al DNA, donde inhiben la continuación de la síntesis o causan un elevado nivel de mutación. Las diferencias en la capacidad de las polimerasas bacterianas o víricas de incorporar análogos de los nucleótidos pueden ser aprovechadas para el diseño de tratamientos terapéuticos que actúen sobre las células infectadas.

Movimiento de la horquilla de replicación

La separación de las hebras complementarias, que permite que cada una de ellas sirva de molde para una nueva hebra complementaria, crea una estructura denominada **horquilla de replicación** (Figura 4.4). Recuerde que las hebras apareadas del DNA tienen polaridad opuesta. Por lo tanto, una de las hebras hijas está orientada con el extremo 3′ hacia la horquilla, mientras que en la otra hebra es el extremo 5′ el que está orientado hacia la horquilla. Esta situación complica el proceso de replicación. Los procariotas y los eucariotas resuelven los problemas de la replicación básicamente de la misma forma. Se utilizan los mismos tipos de actividades enzimáticas, pero los enzimas se asocian en complejos distintos. En primer lugar abordaremos los cambios que sufre el DNA y a continuación las proteínas implicadas.

El problema de la polaridad

La polaridad opuesta de las hebras en la horquilla de replicación presenta de inmediato un problema para la replicación (Figura 4.5*a*). La hebra con su 3′-OH orientado hacia la horquilla puede ser extendida simplemente por adición secuencial de nuevos nucleótidos a su extremo; esta hebra se denomina **conductora** o **continua**. El problema es la otra cadena: ninguna DNA polimerasa cataliza la adición de nucleótidos al extremo 5′ de una cadena. Sin embargo, a escala macroscópica la replicación progresa efectivamente a lo largo de ambas hebras en la dirección del movimiento de la horquilla. El problema se soluciona sintetizando una de las hebras en una serie de fragmentos cortos, cada uno en la dirección normal de 5′ a 3′, que posteriormente se unen (Figura 4.5*b*). Esta síntesis se denomina **semidiscontinua**, y la hebra formada, **discontinua** o **retrógrada** (que se mueve hacia atrás). Los pequeños fragmentos de que está hecha la hebra retrógrada se denominan **fragmentos de Okazaki** en homenaje a Reiji Okazaki, que descubrió este proceso. Los fragmentos de Okazaki de las células humanas tienen unos 130-200 nucleótidos. En *E. coli* son unas diez veces mayores.

Cebado

Las DNA polimerasas requieren **cebadores**. La hebra conductora (continua) necesita ser cebada una sola vez, durante la iniciación de la replicación. Pero cada fragmento de Okazaki de la hebra retrógrada requiere un cebador propio. Estos cebadores son

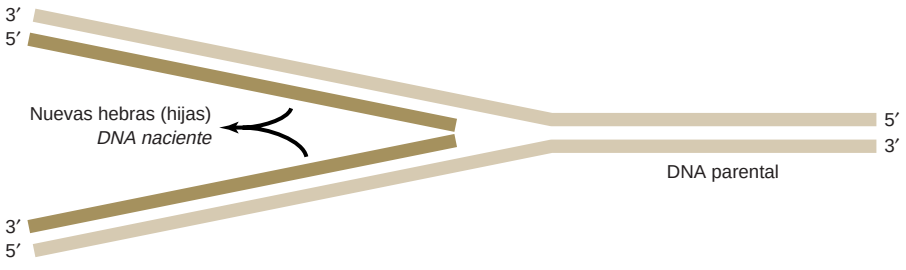


FIGURA 4.4
Síntesis semiconservadora del DNA.
La síntesis del DNA ocurre en la horquillas de replicación. La hebras parentales se separan y cada una sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena (hija). El resultado son dos dúplex, cada uno con una hebra vieja y una nueva.

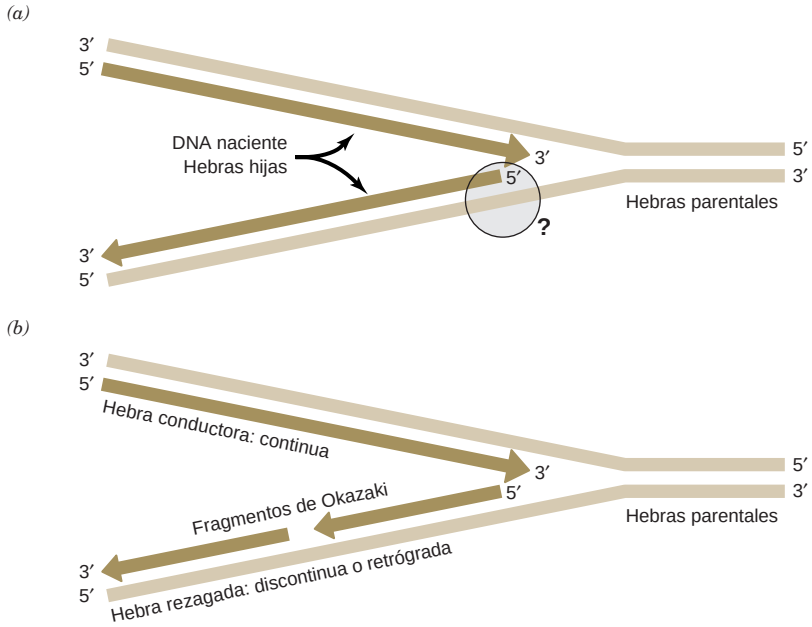


FIGURA 4.5
El problema de la polaridad.
(*a*) El problema: La horquilla de replicación progresa con una replicación casi simultánea en ambas hebras. Las hebras del DNA se sintetizan sólo del extremo 5′ hacia el extremo 3′; ninguna polimerasa puede sintetizar de 3′ a 5′. Pero las cadenas del DNA son antiparalelas. ¿Cómo puede elongarse la cadena con el extremo 5′ contiguo a la horquilla de replicación? (*b*) La solución: Síntesis semidiscontinua del DNA. Ambas hebras son elongadas en sus extremos 3′. La que tiene el extremo 3′ cerca de la horquilla puede crecer continuamente; se denomina hebra conductora. La que tiene el 5′ cerca de la horquilla se sintetiza en una serie de fragmentos cortos, denominados fragmentos de Okazaki, cada uno sintetizado de 5′ a 3′ y unidos posteriormente. Esta hebra se denomina rezagada, discontinua o retrógrada.

cortos fragmentos de RNA, sintetizados por un enzima específico denominado **primasa**. En las células eucarióticas los cebadores de RNA tienen unos 8-10 nucleótidos. Suministran un 3′-OH al cual puede unirse covalentemente el primer desoxirribonucleótido (Figura 4.6).

Síntesis
Las hebras de DNA crecen mediante ciclos repetidos de adición de nucleótidos a los extremos 3′-OH de las cadenas mediante el mecanismo mostrado en la Figura 4.2. Esta reacción está catalizada por una DNA polimerasa.

Eliminación de los cebadores
Las cadenas de DNA recién sintetizadas no contienen cortos fragmentos de RNA en el lugar donde se encontraban los cebadores. Los cebadores de RNA son eliminados de los extremos 5′ de los fragmentos de Okazaki por enzimas con actividad **RNasaH** (**RNA hibridasa**). La RNasaH cataliza la hidrólisis de una cadena de RNA unida por puentes de hidrógeno a una cadena de DNA (es decir, un híbrido RNA-DNA). Todos los ribonucleótidos son eliminados; sólo permanece el DNA.

Relleno del hueco
La eliminación de los cebadores deja **huecos**. Los huecos se rellenan mediante síntesis con desoxirribonucleótidos hasta dejar sólo una **mella**. Tome nota de la terminología: un hueco significa que falta al menos un nucleótido. Una mella es una interrupción de la cadena fosfodiéster sin que falte ningún nucleótido. El hueco se rellena con desoxirribonucleótidos por la acción de una DNA polimerasa, que utiliza como cebador el fragmento de Okazaki sintetizado más recientemente. El fragmento de Okazaki suministra un complejo cebador-molde estable que permite que la corrección de pruebas se efectúe con precisión

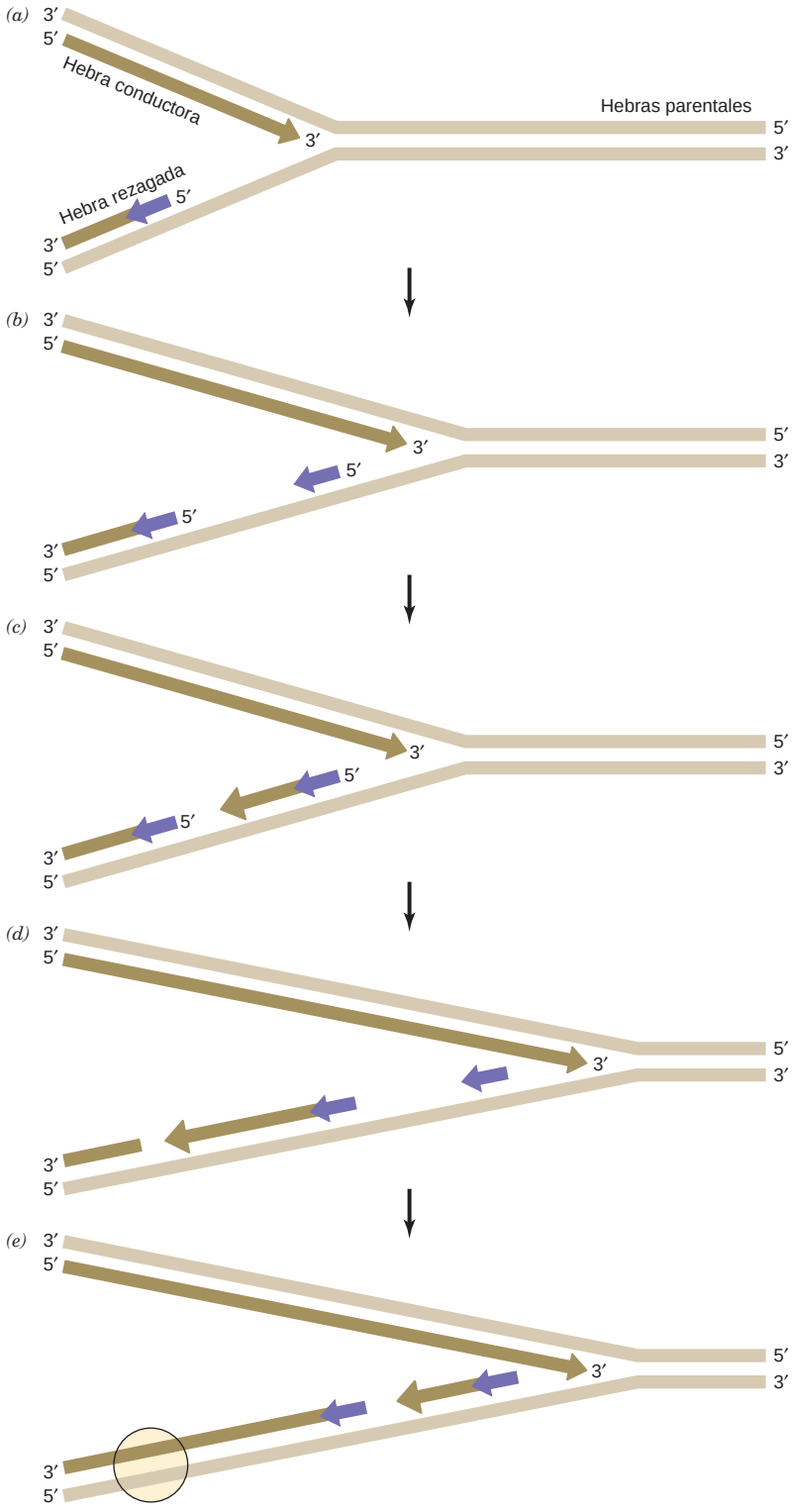


FIGURA 4.6
Síntesis se DNA en la horquilla de replicación.
(*a*) La hebra conductora es elongada desde el extremo 3′ mediante ciclos repetidos de adición de nucleótidos, como se muestra en la Figura 4.2. En la otra hebra se muestra un fragmento de Okazaki con un corto cebador de RNA previamente sintetizado. (*b*) La primasa sintetiza un cebador de RNA (púrpura) sobre el molde de la hebra rezagada. (*c*) Una DNA polimerasa extiende covalentemente el extremo 3′ del cebador de RNA incorporando desoxirribonucleótidos (color oscuro), tal como se muestra en la Figura 4.2. (*d*) Cuando el fragmento de Okazaki en crecimiento alcanza un fragmento previamente sintetizado, el cebador de RNA del fragmento más viejo es eliminado y una DNA polimerasa que alarga el fragmento de Okazaki rellena el hueco. Mientras tanto, la primasa ha sintetizado un nuevo cebador aprovechando el avance de la apertura de la horquilla. (*e*) Cuando se ha llenado el hueco y sólo queda una mella, una ligasa de DNA une los dos fragmentos (en el círculo). El ciclo de elongación del cebador, eliminación del cebador viejo, rellenado del hueco y empalme de la mella se repite.

Ligación

La mella que queda es empalmada por una **DNA ligasa**. El empalme de la mella requiere la formación de un nuevo enlace fosfodiéster. Por lo tanto requiere energía, que se obtiene acoplando la reacción a la escisión del ATP o del NAD^+. Inicialmente, un residuo de AMP se une al enzima (Figura 4.7), que lo transfiere al extremo 5′ de la mella, en donde actúa como un buen grupo saliente que es desplazado por el 3′-OH del otro lado de la mella.

Separación de las hebras parentales

Para servir de molde, las hebras parentales deben separarse. Para ello se necesita una considerable aportación de energía. La fusión del DNA de cadena doble en dos cadenas sencillas sólo ocurre a elevadas temperaturas, normalmente por encima de 90ºC. Para separar la hebras parentales a temperaturas fisiológicas las células recurren a las **helicasas**. Las helicasas se unen al DNA de cadena sencilla y se mueven a lo largo de su longitud en una dirección determinada, al mismo tiempo que separan las hebras del DNA parental; cada paso requiere consumo de ATP. En ausencia de otras proteínas, la hebras parentales se reasociarían rápidamente por detrás de la helicasa, porque las hebras complementarias están cerca y en el registro correcto. Las **proteínas de unión a DNA de cadena sencilla** (**SSB**) evitan la reasociación. Las SSB se unen al DNA de cadena sencilla, mantienen las hebras separadas, eliminan las estructuras secundarias (horquillas que pueden impedir la polimerización) y alinean las hebras molde para una rápida síntesis del DNA. Las SSB son importantes no sólo en la replicación, sino también en la recombinación y en la reparación.

Problemas topológicos del desenrollamiento de las hebras parentales

Hasta ahora la discusión y las figuras se han simplificado y las hebras se han representado como líneas rectas. No se ha hecho referencia a la necesidad de desenrollar las hebras parentales, que están enrolladas una en torno a la otra una vez cada aproximadamente 10,5 pb (Figura 4.8). Las células no tienen la posibilidad de ignorar el enrollamiento de la hebras. Por ejemplo, en la bacteria *E. coli* el genoma puede replicarse cada 40 minutos aproximadamente. Para desenrollar los $4{,}6 \times 10^6$ pb del DNA completamente en 40 minutos, ¡la velocidad de rotación alcanza las 12 000 rpm! Está claro que el cromosoma entero, plegado de forma compacta dentro de la célula y asociado a grandes complejos de replicación (y de transcripción), no puede rotar sin alterar su composición.

Otro problema que causa la naturaleza en doble hélice del DNA es de tipo **topológico**: en un DNA circular (tal como el cromosoma de *E. coli*, el DNA mitocondrial, el DNA de muchos virus y los plásmidos) o un DNA lineal muy largo cuyos extremos no tengan libertad de rotación (como en nuestros cromosomas, unidos a intervalos a la matriz nuclear), el número de veces que una de las hebras está enrollada en torno a la otra, denominado **número de enlace**, es constante. Este número no puede cambiar sin romper al menos una de las cadenas. En las moléculas de DNA el enrollamiento es de dos tipos: la **torsión** de "Watson y Crick" de una hebra alrededor de la otra aproximadamente cada 10,5 pb y el enrollamiento del eje de la doble hélice (**enzarcillamiento** o **superespiralación**). Ambos son topológicamente equivalentes y pueden interconvertirse; únicamente debe permanecer constante el número de veces que una hebra está ligada en el espacio con la otra, el número de enlace, mientras ambas hebras permanezcan intactas.

Una forma de posibilitar el desenrollamiento y la disminución del número de enlace sería cortar una de las hebras por encima de la horquilla de replicación. Ello haría posible que una hebra girara alrededor de la otra. Sin embargo, una mella representa un serio peligro, porque si la horquilla de replicación alcanzase la mella, ésta se transformaría en un corte en las dos cadenas. Un corte en las dos cadenas compromete seriamente la estabilidad del genoma; si no se repara es letal. Enzimas denominados **topoisomerasas** resuelven el problema del desenlazado catalizando cambios de número de enlace que hacen posible el desenrollamiento y la consiguiente separación de las hebras parentales. Las topoisomerasas cortan transitoriamente la cadena del DNA y después la vuelven a unir. El corte no resulta de la hidrólisis del enlace azúcar-fosfato, sino de una reacción de transesterificación que crea un enlace enzima-fosfato transitorio. El restablecimiento del enlace fosfodiéster de la cadena desplaza al enzima (Figura 4.9). No hay, pues, pérdida o creación neta de enlaces fosfodiéster, sólo un intercambio de grupos en torno al enlace. Esto significa que el "corte" y el "empalme" pueden darse sin necesidad de acoplamiento

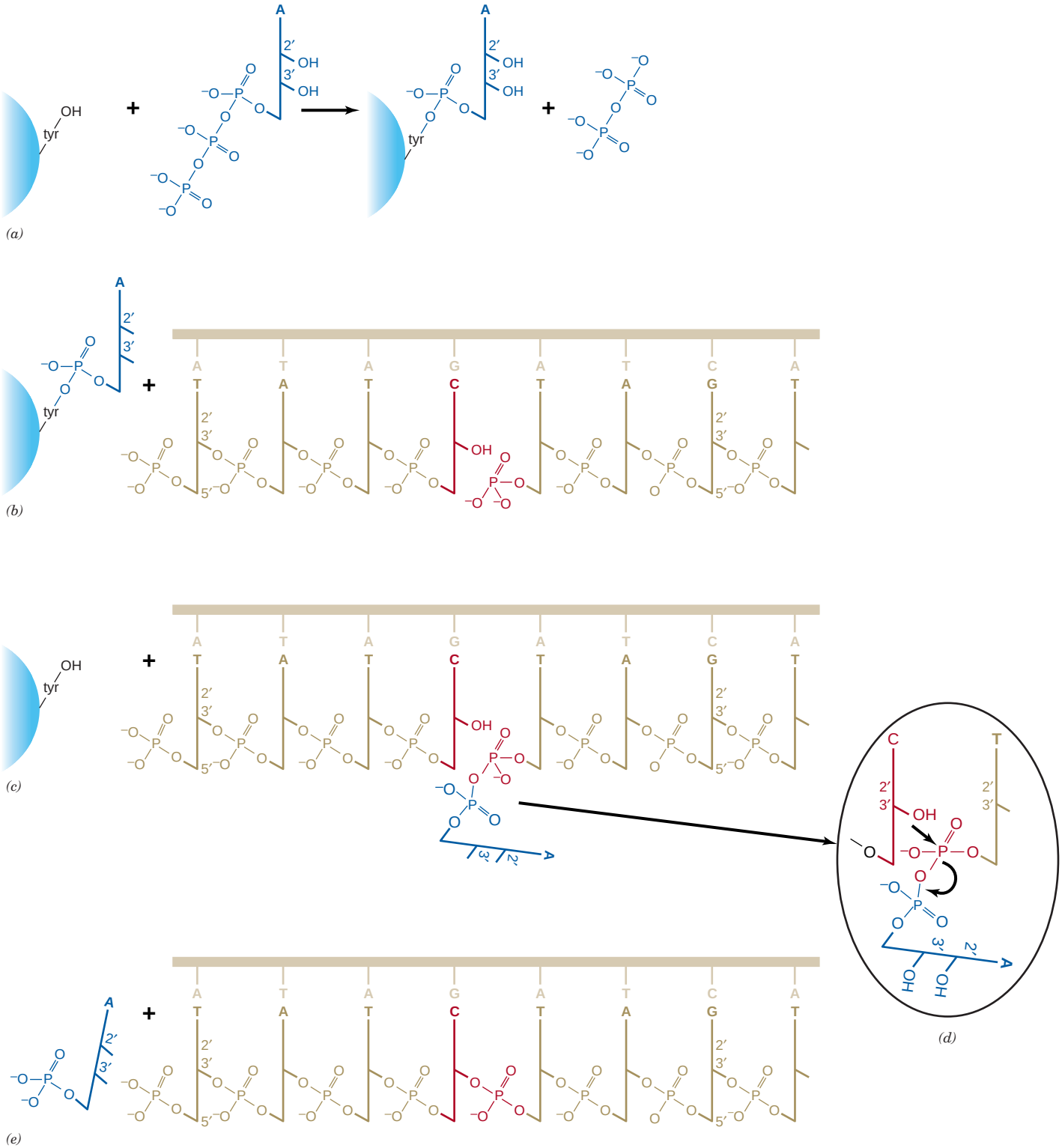


FIGURA 4.7
Mecanismo de la DNA ligasa.
(*a*) La DNA ligasa en primer lugar cataliza la adición de un residuo de AMP a una tirosina del enzima. El dador de AMP puede ser el ATP (que se escinde en AMP + pirofosfato) o NAD^+ (que se escinde en AMP + NMN). (*b*) El complejo ligasa-AMP se une a un dúplex con mellas (la cadena mellada se muestra en rojo). (*c*) La ligasa transfiere el residuo de AMP al fosfato 5′ de la mella. (*d*) El 3′-OH del otro lado de la mella ataca al enlace fosfodiéster más cercano al carbono 5′ para formar un nuevo enlace fosfodiéster en la cadena de DNA con liberación de AMP. Este ataque es similar al que ocurre durante la síntesis del DNA (Figura 4.2), pero con liberación de AMP en lugar de pirofosfato. (*e*) La eliminación de la mella tiene un "coste" de un ATP escindido en AMP + PP_i.

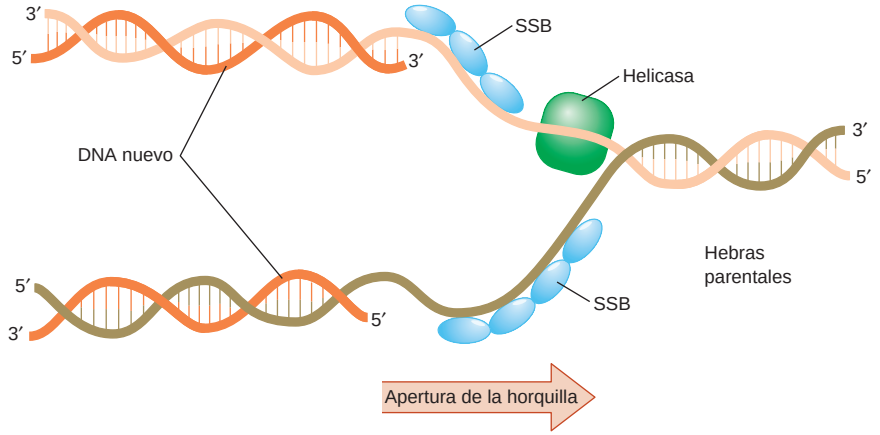


FIGURA 4.8
Separación de las hebras parentales.
Para separar la hebras parentales en condiciones fisiológicas se necesita una helicasa. Hacen falta proteínas de unión a DNA de hebra sencilla (SSB) para mantener las hebras separadas. Pero las hebras parentales están enrolladas una en torno de la otra aproximadamente cada 10,5 bases y deben desenrollarse para poder separarse. Ello crea problemas topológicos.

con un intermediario de alta energía (p. ej., hidrólisis de ATP o de NAD^+). También evita la presencia de mellas estables en el DNA.

Hay dos tipos principales de topoisomerasas: Las topoisomerasas de tipo I realizan un corte transitorio en una de las hebras (formando un enlace proteína-DNA), que permite el giro en torno de la hebra intacta. Ello da lugar a cambios del número de enlace en incrementos de uno. Las topoisomerasas de tipo II realizan cortes transitorios en ambas cadenas (ligeramente desfasados) y pasan la doble hélice a través del corte, cambiando así el número de enlace en incrementos de dos. Ambas desempeñan importantes papeles en la replicación del DNA y son dianas importantes en quimioterapia.

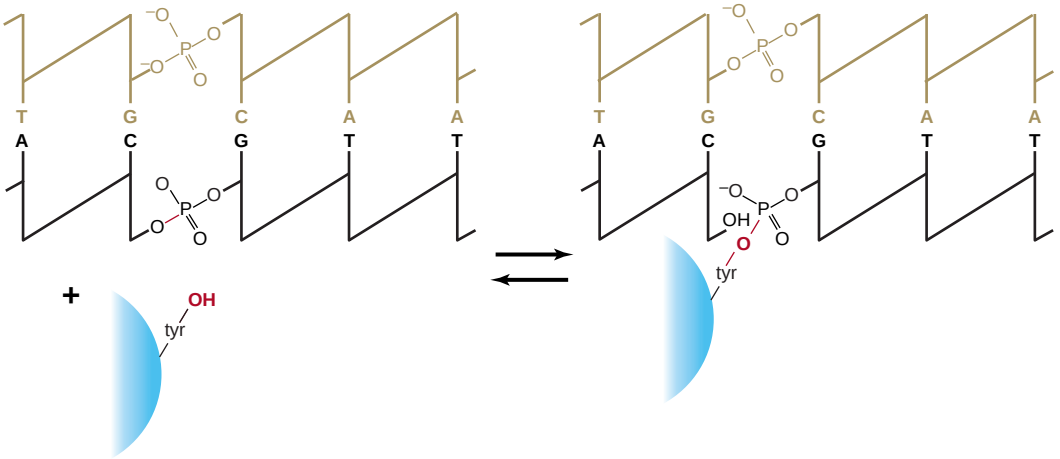


FIGURA 4.9
Mecanismo de la topoisomerasa.
La topoisomerasa I (aquí se representa el enzima de corte y empalme de los mamíferos) cataliza una reacción de transesterificación que produce un enlace fosfodiéster entre el carbono 3′ de un residuo de la cadena del DNA y un residuo de tirosina de la topoisomerasa (panel de la derecha). Se rompe así la continuidad de la cadena azúcar-fosfato y se libera la otra porción de la cadena de DNA, que puede girar alrededor (o pasar a través) de la otra cadena, lo cual permite cambios de número de enlace. A continuación, el 5′-OH del otro lado de la mella ataca al enlace fosfodiéster entre el nucleótido y la proteína, restableciendo la continuidad de la cadena y liberando la proteína (panel de la izquierda). Obsérvese que al tratarse de una serie de reacciones de transesterificación no se necesitan cofactores de alta energía.

Procesividad

Cuando un enzima se une a un polímero y realiza un solo paso de una reacción (p. ej., una polimerasa que añada un solo nucleótido o una exonucleasa que elimine un solo nucleótido) antes de disociarse del sustrato, el proceso se denomina **distributivo**. Por el contrario, cuando un enzima se une y realiza muchas adiciones (o escisiones) antes de disociarse, el mecanismo se denomina **procesivo**. En la replicación, la recombinación y la reparación participan enzimas distributivos y procesivos. Los enzimas distributivos tienden a trabajar más lentamente que los procesivos, porque disociación del molde y reasociación requieren un tiempo.

Las DNA polimerasas procesivas tienen más ventajas para la síntesis rápida de DNA. Con objeto de aumentar la procesividad, las DNA polimerasas replicativas se asocian a proteínas accesorias denominadas **abrazaderas deslizantes**, que las mantienen en contacto con la cadena de DNA en crecimiento. Las abrazaderas deslizantes son multímeros que se unen en torno a la doble hélice del DNA, formando una molécula toroidal con el DNA enhebrado en el agujero (Figura 4.10). La unión a la abrazadera deslizante aumenta la procesividad de la DNA polimerasa, con el resultado de una mayor velocidad y fidelidad de síntesis.

Coreografía en tres dimensiones

La compleja coreografía descrita anteriormente transcurre en un espacio muy limitado: una pequeña célula bacteriana o el núcleo de una célula eucariótica. Este pequeño volumen contiene muchas otras moléculas que desempeñan sus propias funciones. La idea de dos voluminosos complejos de replicación que se mueven rápidamente a lo largo del DNA en cada horquilla de replicación y dan vueltas en torno al DNA para acomodarse a su estructura helicoidal no se sostiene. Es más sencillo que el DNA, delgado y cilíndrico, gire alrededor de su eje y que se mueva a través de un gran complejo de replicación. La asociación de las polimerasas que trabajan en la hebras conductora y rezagada permite que el DNA pase a través de este

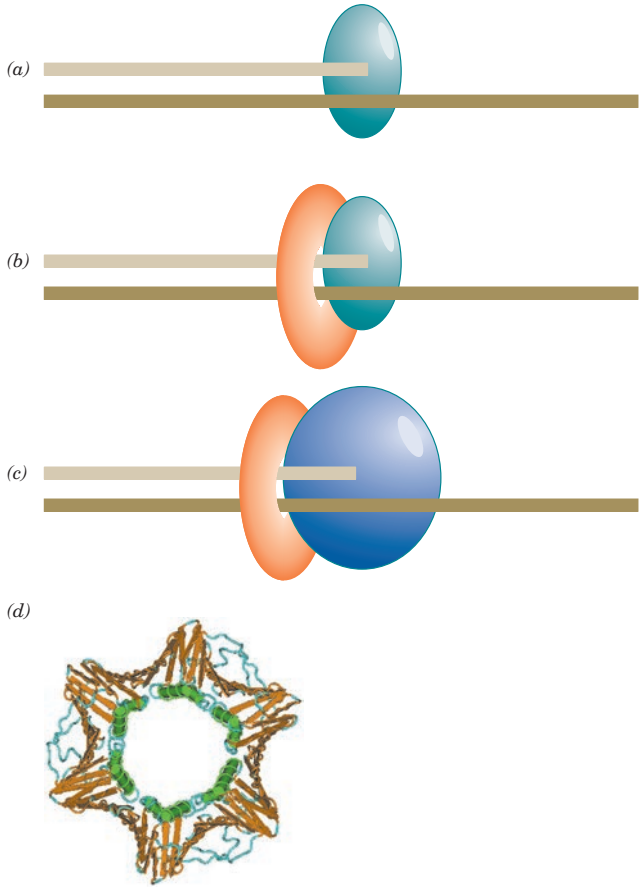


FIGURA 4.10
Abrazaderas deslizantes.
(*a*) La proteína de carga de la abrazadera se une al DNA. (*b*) El cargador de la abrazadera ensambla las subunidades de la abrazadera. (*c*) La DNA polimerasa se asocia con la abrazadera y adquiere procesividad. (*d*) La estructura de la abrazadera deslizante de las células de mamífero es un trímero de subunidades PCNA. El DNA pasa libremente a través del amplio agujero en el centro del complejo.

gran complejo, denominado **replisoma**, a medida que ambas cadenas son sintetizadas (Figura 4.11). La hebra continua pasa directamente a través del complejo; la hebra retrógrada se une para permitir la síntesis de un fragmento de Okazaki y a continuación es liberada para que tengan lugar los pasos de finalización (eliminación del cebador, rellenado del hueco y ligación), mientras que se une el molde de una parte más adelantada de la molécula para permitir las síntesis del siguiente fragmento de Okazaki.

Enzimas procarióticos

Los enzimas de la replicación en *E. coli* se muestran en la Figura 4.12. La principal DNA polimerasa replicativa de *E. coli* es la **DNA polimerasa III** (pol III). La pol III sintetiza la hebra continua y la mayor parte de la hebra discontinua (retrógrada). La pol III es un gran complejo de subunidades que desempeñan diversas funciones. El núcleo de la polimerasa contiene una subunidad α que cataliza la formación del enlace fosfodiéster, una subunidad ε que actúa de exonucleasa de 3′ a 5′ correctora de pruebas, y una subunidad θ. La abrazadera deslizante consta de dos subunidades β que se ensamblan sobre el DNA con ayuda del complejo γ (el cargador de la abrazadera), en un proceso que requiere la hidrólisis de ATP. Las dos subunidades β forman un anillo alrededor de la doble hélice, que puede deslizarse a lo largo de su longitud, pero que no puede disociarse hasta que otros factores desensamblan el complejo. El complejo formado por pol III y las proteínas de la abrazadera deslizante es muy procesivo y puede sintetizar DNA prácticamente de manera indefinida hasta acabar con el molde o topar con determinados tipos de lesiones del DNA. En la hebra rezagada, el complejo abandona el DNA cuando encuentra el fragmento de Okazaki anterior. La subunidad τ mantiene unidas a dos moléculas de pol III que sintetizan las hebras conductora y rezagada en un gran complejo.

Sobre la hebra rezagada, la DNA primasa y la DnaG forman un complejo con la helicasa DnaB (DnaB). La DnaB es responsable del movimiento del complejo a lo largo del molde de la hebra discontinua que separa las hebras parentales. Este movimiento requiere la hidrólisis de ATP. El DNA de cadena sencilla generado por la helicasa está recubierto por **la proteína de unión específica a DNA de cadena sencilla (SSB)**, que impide la renaturalización de las hebras parentales y la formación de lazos en horquilla y otras estructuras secundarias en el DNA de cadena sen-

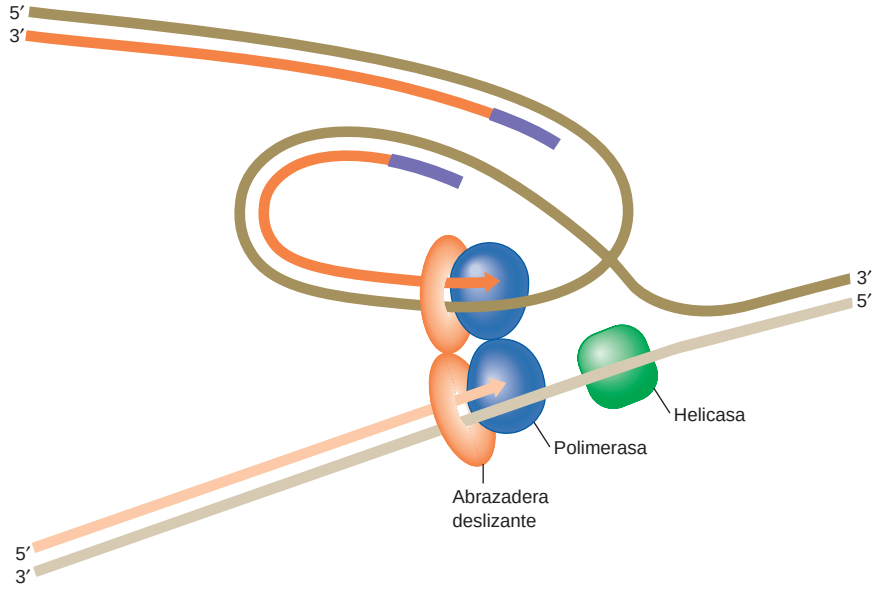


FIGURA 4.11
Replicación de las dos cadenas en un replisoma.
Uniendo dos moléculas de polimerasa replicativa y formando un lazo con la hebra rezagada para que pueda pasar a través del complejo es posible sintetizar ambas cadenas en el mismo sitio. El DNA gira alrededor de su eje a medida que pasa a través del complejo; los grandes complejos proteicos no tienen que girar alrededor del DNA.

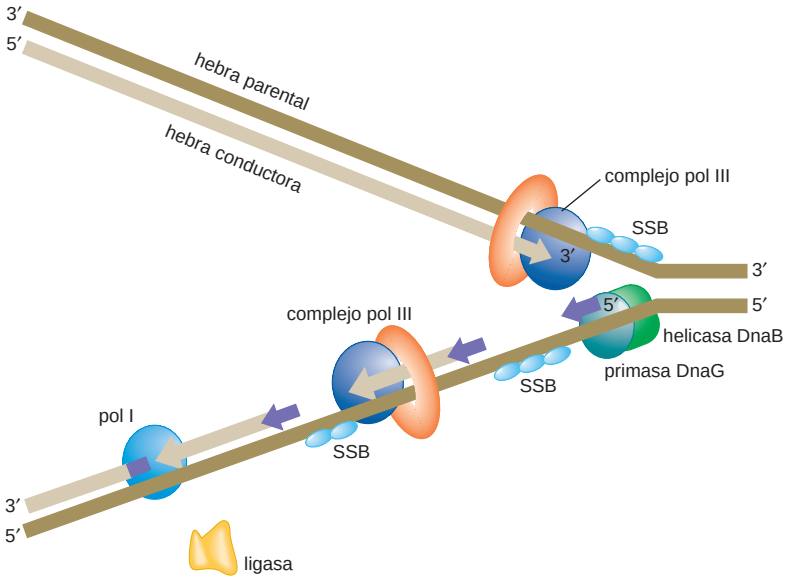


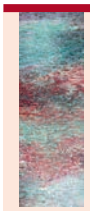
FIGURA 4.12
Enzimas de la replicación de *E. coli*.
En la parte superior se muestra la elongación de la hebra continua por la pol III asociada a la abrazadera deslizante. El complejo DNA helicasa/primasa (DnaB/DnaG) se mueve a lo largo del molde de la hebra rezagada; se detiene cada 1000-2000 pb para permitir que la DnaG sintetice un cebador de RNA. La pol III extiende el cebador hasta que alcanza al cebador del fragmento de Okazaki sintetizado previamente. Llegados a este punto, la pol III se disocia del DNA y la pol I se une al extremo del fragmento de Okazaki. La pol I elimina el cebador de RNA y al mismo tiempo llena el hueco en un proceso denominado translación de la mella. Cuando sólo queda una mella con desoxirribonucleótidos en ambos lados, la DNA ligasa la empalma.

cilla. El complejo DNA helicasa/primasa se detiene cada 1000-2000 pb y la primasa DnaG sintetiza un corto cebador de RNA. El cebador de RNA es extendido por la DNA pol III unida a una pinza deslizante hasta formar un fragmento de Okazaki de 1000-2000 pb. La elongación se detiene cuando el complejo de la polimerasa se encuentra con el cebador de RNA del fragmento de Okazaki anterior, y el DNA se disocia del complejo de la pol III.

En *E. coli*, tanto la eliminación del cebador como el relleno del hueco son catalizados por el mismo enzima, la DNA polimerasa I (pol I). La pol I reúne varias funciones distintas en una sola cadena polipeptídica. Contiene una exonucleasa de 5′ a 3′ que elimina el cebador de RNA del extremo 5′ del fragmento de Okazaki anteriormente sintetizado, actividad propia de una RNasa H. Contiene una actividad DNA polimerasa que cataliza la adición de desoxirribonucleótidos al extremo 3′ del fragmento de Okazaki más reciente hasta completar el rellenado del hueco creado por la eliminación del cebador. Una actividad exonucleolítica intrínseca de corrección de pruebas en dirección 3′ a 5′ incrementa la fidelidad del rellenado del hueco. La pol I coordina la eliminación del cebador y el rellenado del hueco eliminando un ribonucleótido del cebador y extendiendo el fragmento de Okazaki más reciente con un desoxirribonucleótido. Estos pasos se repiten hasta la completa eliminación del cebador. La pol I es capaz de avanzar a lo largo del DNA eliminando y reemplazando desoxirribonucleótidos, una actividad denominada "translación de la mella". Este proceso sería gravoso si no fuese porque la pol I actúa de manera distributiva. Cuando el hueco ha sido rellenado y sólo queda la mella, la disociación de la pol I permite la unión de la **DNA ligasa** a la mella y la catálisis de la formación de un enlace fosfodiéster que une el fragmento de Okazaki a la cadena en proceso de crecimiento.

Como se discutió anteriormente, el cromosoma circular de *E. coli* se encuentra **topológicamente restringido**. No obstante, la doble hélice parental debe desenrollarse completamente para que la replicación y la segregación de los cromosomas tengan lugar. La replicación requiere la eliminación de vueltas positivas, pues el número de enlace de las hebras parentales debe reducirse desde un valor positivo elevado (están enrolladas una en torno a la otra una vez cada 10,5 pb) hasta cero. Las **topoiso-**

merasas son, pues, indispensables para la replicación del DNA. *Escherichia coli* tiene topoisomerasas de tipo I y de tipo II. La topoisomerasa I de *E. coli* se denomina proteína omega (***ω***). Omega actúa unidireccionalmente, eliminando sólo las vueltas superhelicoidales negativas. Por lo tanto, ***ω*** no es suficiente para que pueda tener lugar la replicación del DNA. La **DNA girasa**, una topoisomerasa de tipo II, es indispensable para la replicación del DNA. La DNA girasa elimina vueltas superhelicoidales positivas o introduce vueltas superhelicoidales negativas; la dirección es la misma. La girasa es un heterotetrámero con dos subunidades "pivotasa" codificadas por *gyrA* y dos subunidades ATPasa codificadas por *gyrB*. Las subunidades pivotasa catalizan reacciones de transesterificación que cortan y empalman la cadena fosfodiéster. La acción de la girasa está acoplada a la hidrólisis del ATP, que no es necesaria para formar el enlace fosfodiéster, sino para desencadenar los cambios conformacionales que permiten que la doble hélice pase a través del espacio transitorio resultante de la rotura de la doble cadena, operación que provoca una disminución unidireccional del número de enlace. Los antibióticos que actúan sobre una u otra subunidad de la DNA girasa detienen rápidamente la replicación en *E. coli*. Esta bacteria tiene una segunda actividad topoisomerasa de tipo II, denominada topoisomerasa IV, que es importante en la segregación de los cromosomas en las células hijas (véase la Apli. Clín. 4.1).



APLICACIÓN CLÍNICA 4.1

Las topoisomerasas como dianas farmacológicas

Los antibióticos que actúan sobre cualquiera de las subunidades de la DNA girasa detienen rápidamente la replicación de *E. coli*, porque al bloquear la disminución del número de enlace de las hebras parentales obstaculizan el desenrollamiento de las mismas. Hay dos maneras de interferir en la acción de las topoisomerasas. Los inhibidores de las topoisomerasas impiden la actividad catalítica. La cumermicina A1 y la novobiocina son inhibidores que actúan sobre la subunidades ATPasa codificadas por gyr*B*. Algunos compuestos estabilizan los enlaces covalentes DNA-proteína; estos complejos son letales si se convierten en cortes de doble cadena durante la replicación. El ácido nalidíxico actúa sobre las subunidades pivotasa codificadas por gyrA. La ciprofloxacina, otro agente antitopoisomerasas, es uno de los antibióticos orales de uso corriente más efectivos.

Enzimas eucarióticos

Los eucariotas requieren los mismos tipos de actividades enzimáticas porque la replicación sigue esencialmente las mismas pautas. Las diferencias de estructura de los enzimas de humanos y bacterias se aprovechan como terapia antibacteriana para bloquear la replicación del agente patógeno sin dañar a las células huésped.

La hebra continua es sintetizada en una horquilla de replicación por la DNA polimerasa ***δ***, asociada a la abrazadera deslizante, llamada **PCNA** (antígeno nuclear de células en proliferación). El PCNA se detectó por primera vez como un antígeno de los núcleos de células en proceso de proliferación, de ahí su nombre. Tres subunidades de PCNA se ensamblan para formar un anillo en torno al DNA, al cual se une la DNA polimerasa ***δ*** (Figura 4.10). El ensamblaje del anillo requiere un **factor de carga de la abrazadera** denominado factor C de replicación (RFC).

La situación en la hebra rezagada es ligeramente más compleja que en *E. coli* (Figura 4.13). La actividad helicasa en los eucariotas separa las hebras parentales y una proteína de unión a DNA de cadena sencilla, denominada **proteína A de replicación (RPA)**, se une a las cadenas sencillas que han quedado expuestas. En los eucariotas, la primasa forma un complejo con la DNA polimerasa ***α*** que inicia la síntesis de los fragmentos de Okazaki. Este complejo **pol α/primasa** sintetiza un cebador de aproximadamente 10 bases y a continuación cambia la actividad primasa por la actividad DNA polimerasa que extiende el cebador con aproximadamente 15-30 desoxirribonucleótidos. El producto de esta doble reacción es un corto fragmento de DNA unido al cebador de RNA. Una vez que el fragmento de Okazaki ha alcanzado esta longitud, el complejo pol ***α***/primasa se disocia del DNA. El RFC se une a este cebador extendido y actúa de **cargador de la abrazadera** para ensamblar la abrazadera deslizante. La polimerasa ***δ*** se une al PCNA y completa el fragmento de Okazaki hasta una longitud total de 130-200 bases. El complejo pol ***δ***/PCNA libera al DNA cuando topa con el extremo 5′ del fragmento de Okazaki previamente sintetizado. A continuación se une al siguiente fragmento de Okazaki parcialmente sintetizado. Como en *E. coli*, dos moléculas de la polimerasa replicativa principal, en este caso la pol ***δ***, se unen para formar la "factoría replicativa" en la cual se sintetizan las dos cadenas (Figura 4.10). Una polimerasa relacionada, la pol ***ε***, es esencial para la viabilidad, pero se desconoce su papel en la replicación.

La eliminación del cebador se realiza en dos etapas a cargo de dos enzimas, la RNasa H y la FEN1. La **RNasa H** degrada el cebador de RNA hasta dejar un solo ribonucleótido en el extremo del fragmento de Okazaki. La **FEN1 (endonucleasa flap 1)** es necesaria para eliminar el último ribonucleótido. La FEN1 actúa disociando los puentes de hidrógeno de uno o unos pocos nucleótidos para formar un pequeño "flap" (solapa) para a continuación cortar (corte endonucleolítico) el enlace fosfodiéster en el ángulo con la doble cadena para liberar el flap. Un importante aspecto de esta reacción es que si hubiese un nucleótido desapareado entre los primeros nucleótidos del fragmento de Okazaki, como consecuencia de un error de la pol ***α***, la desestabilización del extremo 5′ resultante del desapareamiento repercutiría en

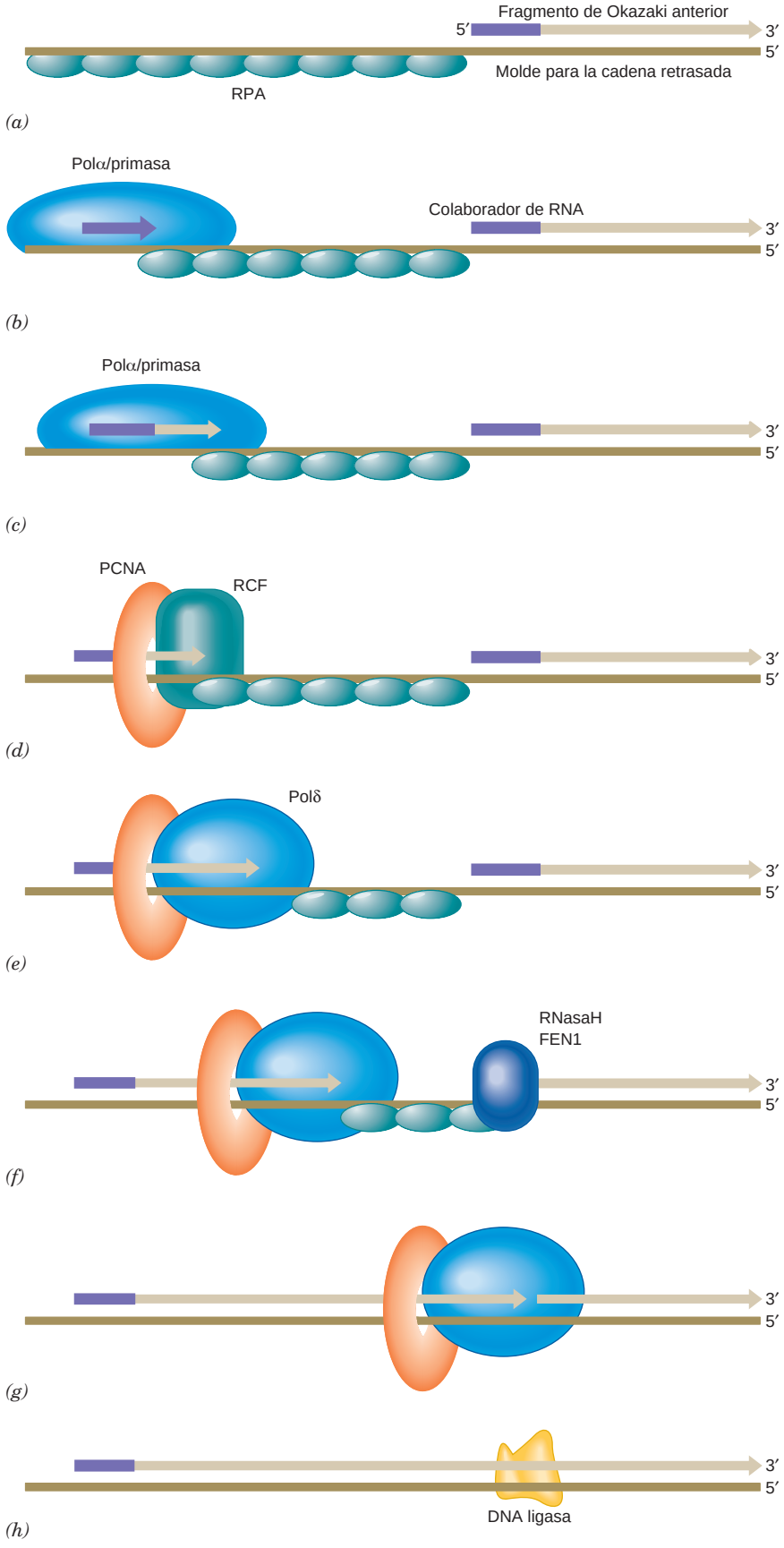


FIGURA 4.13
Enzimas de la replicación de la hebra rezagada en los eucariotas (no se muestra la hebra conductora).
(*a*) La RPA, una proteína de unión a DNA de cadena sencilla, se une al molde de cadena sencilla que ha sido expuesto por el avance de la horquilla de replicación. El fragmento de Okazaki anterior se muestra a la derecha, con el cebador de RNA en púrpura. (*b*) La actividad primasa del complejo pol α/primasa inicia la síntesis de un cebador de RNA. (*c*) Cuando el cebador de RNA alcanza los 10 nucleótidos, la actividad pol α del complejo pasa a ser dominante y extiende el cebador en 20-30 desoxirribonucleótidos. A continuación la pol α/primasa se disocia. (*d*) La RFC se une al extremo del fragmento de Okazaki parcialmente sintetizado y cataliza la unión de la abrazadera deslizante a partir de tres moléculas de PCNA. (*e*) El complejo pol δ se une a la abrazadera deslizante y extiende el fragmento de Okazaki. (*f*) A medida que el complejo de replicación se aproxima al cebador de RNA, el cebador es degradado por la acción combinada de la RNasaH y la FEN1. (*g*) El hueco se rellena por la elongación continuada del fragmento de Okazaki. (*h*) La mella que queda es eliminada por la DNA ligasa.

la formación de un flap mayor que podría ser cortado por la FEN1. Este proceso aumenta la fidelidad de la replicación al eliminar alguno de los errores introducidos por la pol α. El hueco restante es rellenado por la pol δ, que extiende el extremo 3′ del fragmento de Okazaki más reciente. La mella restante es sellada por la DNA ligasa.

El DNA eucariótico está empaquetado en los **nucleosomas** que contienen aproximadamente 200 pb de DNA. La disociación de los nucleosomas es necesaria para la replicación y probablemente limite la velocidad de síntesis del DNA. Cuando se disocia un único nucleosoma se exponen aproximadamente 200 pb de DNA, cuyas hebras pueden ser separadas y los cebadores sintetizados en algún punto del DNA de cadena sencilla. Ello explicaría el tamaño limitado de los fragmentos de Okazaki.

En humanos se encuentran topoisomerasas de tipo I y de tipo II. La topoisomerasa de tipo I, llamada enzima de corte y empalme, es capaz de eliminar vueltas superhelicoidales tanto positivas como negativas y actúa durante la replicación y la transcripción. La topoisomerasa II humana no es una girasa, pues no introduce vueltas superhelicoidales negativas, pero es esencial en la terminación y en la segregación de los cromosomas, y también parece intervenir en la fijación del DNA a lugares determinados de la matriz nuclear durante la interfase. La quimioterapia del cáncer a menudo tiene por diana a las topoisomerasas; el resultado son cortes de doble cadena durante la replicación. Las células en rápida replicación son más sensibles a estos fármacos que las células quiescentes.

Orígenes de replicación

En el apartado anterior examinamos la progresión de la horquilla de replicación ¿Cómo arranca la horquilla de replicación? Es una pregunta clave porque la replicación se regula determinando en qué momento se inicia un ciclo de replicación. Una vez iniciado, las células generalmente completan el proceso de replicación. La replicación incompleta del genoma provocaría inestabilidad cromosómica y pérdida de información genética. Si una parte del DNA cromosómico no se replica, los cromosomas hijos no pueden separarse correctamente o pueden romperse en el intento. Los cromosomas rotos son inestables y desencadenan la recombinación, que causa problemas adicionales. La falta de genes clave en una célula carente de un cromosoma debido a la segregación imperfecta o la expresión excesiva de otros genes en una célula con una copia extra de un cromosoma puede tener graves consecuencias. En humanos, la pérdida de una pareja de cromosomas en las células del feto normalmente provoca el aborto. La presencia de un cromosoma adicional es casi siempre letal, excepto la trisomía de unos pocos cromosomas pequeños, que provoca serios trastornos en los recién nacidos. El síndrome de Down esta causado por la trisomía de cromosoma 21.

La replicación empieza en sitios específicos denominados **orígenes de replicación** (**ori**). Los orígenes de replicación conocidos contienen múltiples secuencias cortas repetidas a las que se unen proteínas específicas y regiones ricas en A-T en las cuales tiene lugar la separación inicial de las hebras parentales. El cromosoma de *E. coli* tiene un único origen de replicación, *OriC* (origen de la replicación del cromosoma), una región de aproximadamente 245 pb. En las células eucarióticas hay millares de orígenes de replicación (Figura 4.14). En levadura, los *oris* se denominan **secuencias se replicación autónoma (ARS)**. En humanos, las secuencias que actúan de *ori* no han sido identificadas.

Proceso de iniciación

En *E. coli*, una **proteína de iniciación**, denominada **DnaA**, se une a *oriC*. La **DnaC**, que se une a continuación, tiene por función facilitar la unión de la **DnaB**, la helicasa, que separa las hebras parentales para crear la horquilla de replicación. En el *ori* se forma una burbuja de replicación con dos horquillas de replicación que se alejan del *ori* en direcciones opuestas. La replicación es, pues, **bidireccional**.

Los eucariotas contienen secuencias especiales sobre las cuales se ensambla un gran complejo de proteínas denominado **complejo de reconocimiento del origen (ORC)**, que inicia la formación de las horquillas de replicación (Figura 4.15). El ensamblaje de un ORC en un origen no es suficiente para la iniciación. Un segundo complejo, denominado **MCM (proteínas de mantenimiento del minicromosoma),** que posee una ligera actividad helicasa, debe unirse y activarse. Los pasos de activación están regulados por ciclinas y por proteína quinasas dependientes de ciclinas.

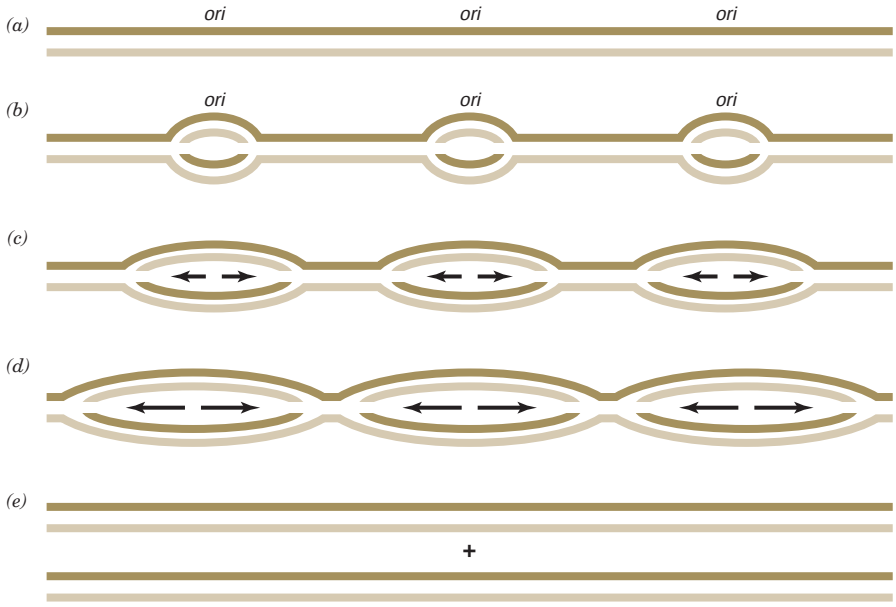


FIGURA 4.14
Replicones en tándem y replicación bidireccional en los eucariotas.
(*a*) Hay múltiples orígenes de replicación (*ori*) dispuestos en tándem a lo largo de todos los cromosomas eucarióticos. En humanos están espaciados cada 50 000-100 000 pb. (*b*) La iniciación ocurre en cada origen (*ori*). Los grupos de *oris* adyacentes tienden a funcionar simultáneamente. (*c*) En cada *ori* hay dos horquillas de replicación, por lo que la replicación es bidireccional. Estas estructuras se denominan burbujas de replicación. (*d*) Las burbujas de replicación crecen a medida que progresa la replicación hasta que se encuentran cerca unas de otras. En este punto la terminación de la replicación une las burbujas adyacentes y desenlaza el DNA parental. La topoisomerasa II es esencial para la terminación y la segregación. (*e*) Los cromosomas replicados resultantes pueden entonces segregarse.

Una vez que ha sido activado en un *ori*, el complejo ORC/MCM cataliza la reparación de las hebras parentales para formar una pequeña **burbuja de replicación** (Figura 4.15). Las SSB se unen para mantener las hebras separadas. Las **helicasas** se incorporan a la burbuja de replicación para desenrollar las hebras en la horquilla de replicación. La iniciación de la síntesis del DNA usa muchos de los mecanismos responsables del movimiento de la horquilla de replicación. Una primasa inicia la síntesis de un cebador de RNA, que es extendido por una DNA polimerasa de la misma forma que en la hebra retrógrada de una horquilla de replicación. La polimerasa que extiende esta primera hebra puede continuar la síntesis y formar la hebra conductora de la horquilla en uno de los lados de la burbuja de replicación. En esta mitad de la burbuja se inicia la síntesis del primer fragmento de Okazaki de la hebra retrógrada mediante el mismo mecanismo utilizado en el movimiento de la horquilla de replicación. Sin embargo, puesto que este primer fragmento de Okazaki no colisiona con un fragmento anterior, continúa creciendo en la dirección 5′ a 3′ y se convierte en la hebra conductora de la horquilla opuesta. En el lado opuesto se sintetizan fragmentos de Okazaki. El resultado son un par de horquillas de replicación que divergen del origen.

El ciclo celular

En los eucariotas hay un patrón de actividades distintas y regulables que constituye el **ciclo celular** (Figura 4.16). La característica morfológica más destacable del ciclo celular es la mitosis o **fase M**, consistente en la condensación, alineamiento y separación de los cromosomas, que precede a la división de la célula en dos. La replicación del DNA tiene lugar durante la **fase S** (síntesis). La **fase G1** se encuentra entre la mitosis y la fase S y la **fase G2** entre la fase S y la mitosis.

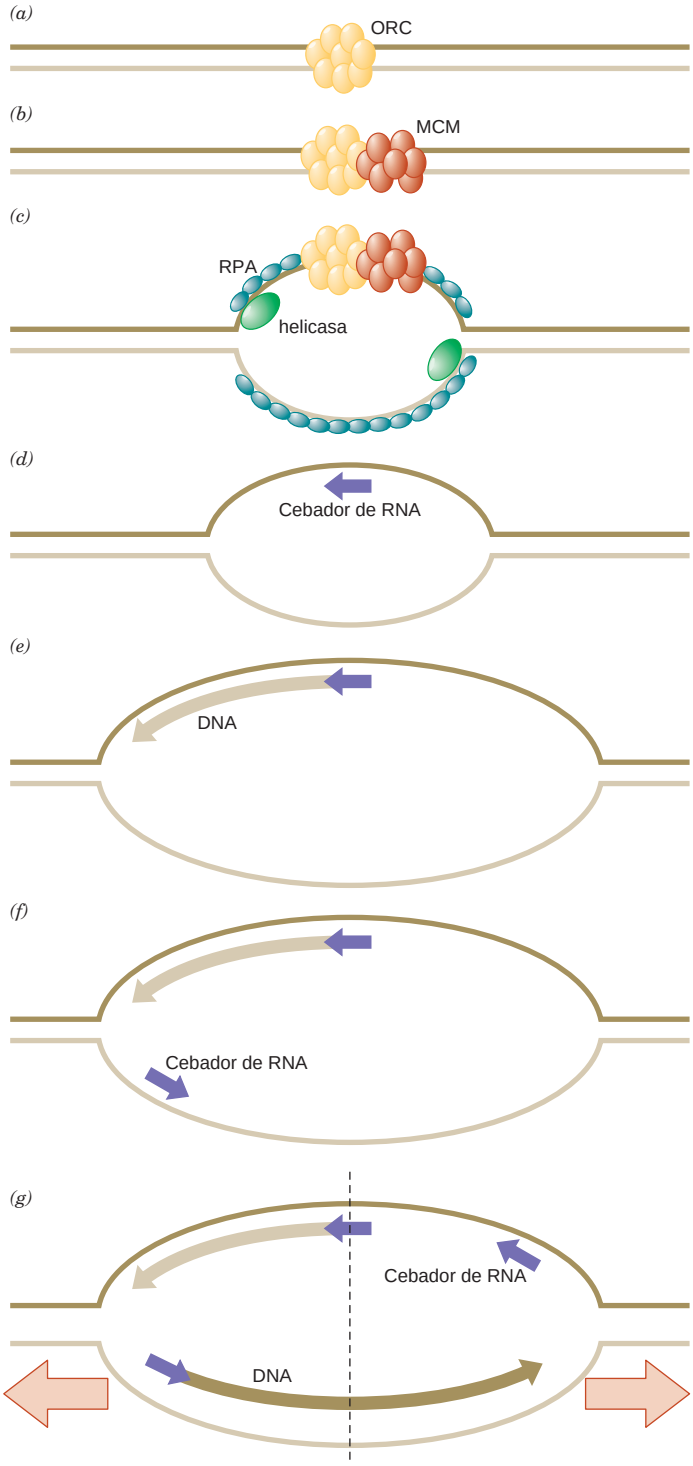


FIGURA 4.15
Iniciación de la replicación en un origen de replicación eucariótico. (*a*) El complejo de reconocimiento del origen (ORC) se une a un *ori*. (*b*) A continuación se une un complejo MCM; cdc6 es importante en el ensamblaje. (*c*) Después de una señal apropiada, regulada en una etapa específica del ciclo celular, se activa el complejo de iniciación y la helicasa separa las hebras parentales para formar una pequeña burbuja. La SSB (RPA) se une a las hebras sencillas, las helicasas se unen al DNA y la burbuja crece. (*d*) La pol α/primasa sintetiza el primer cebador de RNA y el primer fragmento corto de DNA. (En este panel y en los siguientes se destacan los procesos que afectan al DNA, por lo que no se representan las proteínas.) (*e*) El cebador de RNA es extendido por una RNA polimerasa δ, que incorpora desoxirribonucleótidos. Hasta este punto, el proceso es idéntico al que ocurre en la hebra discontinua. Sin embargo, la hebra en crecimiento no encontrará un fragmento de Okazaki previo; puede continuar extendiéndose como hebra conductora de la horquilla de replicación que se mueve hacia la izquierda. (*f*) En el lado discontinuo de esta horquilla de replicación se sintetiza un cebador de RNA como en el avance normal de la horquilla. (*g*) Este cebador se extiende como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la hebra en crecimiento no encontrará un fragmento de Okazaki previo; puede continuar extendiéndose, y se convertirá en la hebra conductora de la horquilla de replicación que se mueve hacia la derecha. Se puede sintetizar un cebador de RNA en esta cadena mediante el mecanismo habitual. El resultado son dos horquillas de replicación que divergen desde el origen. El proceso es simétrico respecto al eje definido por la línea de puntos, con horquillas con simetría especular que divergen desde *ori*.

Para la viabilidad celular es importante que el DNA se haya replicado por completo antes de la mitosis. Las células poseen mecanismos de regulación que aseguran la coordinación de los acontecimientos del ciclo celular. Las lesiones del DNA y el bloqueo de las horquillas de replicación ralentiza el progreso a través de la fase S y la detención del ciclo celular en las transiciones G1/S o G2/M. Estos mecanismos también inducen la síntesis de proteínas que ayudan a la reparación del DNA. En levadura, los mutantes de la pol ε presentan deficiencias en la inducción de los genes de respuesta a las lesiones y en los puntos de control. La PCNA puede desempeñar un importante papel en la coordinación de la replicación y la reparación.

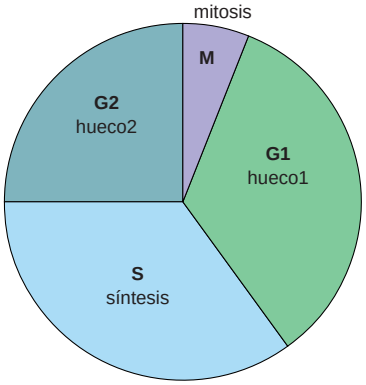
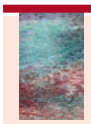


FIGURA 4.16
El ciclo celular.
En la células eucarióticas la replicación del DNA y la mitosis están separadas por las etapas G1 y G2.

La interacción de la PCNA con $p21^{cip1}$, un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, inhibe la replicación pero no la reparación; puede permitir, pues, proceder a la reparación antes de que la replicación continúe (véase la Apli. Clín. 4.2).

En los eucariotas, la iniciación de la replicación en los *ori* debe coordinarse para asegurar que todas las regiones de todos los cromosomas se repliquen en cada ciclo y que cada región no se replique más de una vez. Es, sin duda, un difícil objetivo. Aunque no se conocen todavía los detalles del proceso, se pueden establecer algunos principios generales. El modelo aceptado actualmente se conoce como modelo de "**verificación**". Debe unirse un **factor de verificación** al origen, que permita la replicación a partir de él. Ello ocurre antes del inicio de la fase S y afecta al complejo proteico MCM que se une al complejo de reconocimiento del origen, ORC. La unión está favorecida por proteínas "**encajadoras**", entre las que se encuentra Cdc6. El ensamblaje de este complejo prerreplicativo sólo ocurre durante la fase G1, antes del inicio de la síntesis del DNA. Una vez que se ha iniciado la replicación, el factor de verificación es inactivado por la disociación de la proteína Cdc6 y el complejo proteico MCM. Para que el origen se use de nuevo es necesario que se una un nuevo factor de verificación, pero el ensamblaje del complejo no puede ocurrir hasta la próxima fase G1. Así se evita la reiniciación prematura durante un mismo ciclo celular. Estos procesos están regulados por las actividades quinasa dependientes de ciclina.

Las diferentes partes del genoma se replican en diferentes momentos de la fase S del ciclo celular. Normalmente, la regiones que se transcriben activamente se replican pronto durante la fase S. Por el contrario, la regiones heterocromáticas se replican más tarde.



APLICACIÓN CLÍNICA 4.2
El cáncer y el ciclo celular

El cáncer se caracteriza por una excesiva división celular. Se diagnostica por una proporción de células en división mayor que la esperada para el tejido al que pertenecen. Es decir, una mayor proporción de células en mitosis, que se pueden reconocer por microscopia, y en fase S.

La mayoría de los fármacos usados en la quimioterapia contra el cáncer actúan sobre la replicación del DNA o sobre los enzimas implicados en este proceso. Las células en división son más sensibles a estos compuestos que las células quiescentes. Además de las células cancerosas, objetivo de la terapia, hay otras células en rápida división en el tracto intestinal, la medula ósea y los folículos pilosos. La susceptibilidad de estas células normales, pero en rápida división, explica muchos de los efectos secundarios que limitan la eficacia de las quimioterapia.

Para impedir la replicación se usan muchos tipos de fármacos. Los antimetabolitos interfieren con la síntesis de los precursores de los 5′-dNTP. El metotrexato inhibe la dihidrofolato reductasa, necesaria para mantener el tetrahidrofolato reducido requerido para la síntesis de los nucleótidos. El 5-fluorouracilo inhibe la timidilato sintasa y si es trifosforilado puede incorporarse al DNA y provocar cortes en la cadena. Los alcaloides del género *Vinca* inhiben el ensamblaje de los microtúbulos, y por esta vía interfieren con la mitosis y la segregación de los cromosomas. Los inhibidores de las topoisomerasas ralentizan o detienen la replicación, obstaculizando el desenrollamiento de las hebras parentales. Los inhibidores de las topoisomerasas impiden el restablecimiento del enlace fosfodiéster, dejando complejos DNA proteína que dan lugar a cortes de cadena sencilla.

Muchos de los quimioterápicos más usados son agentes alquilantes, a menudo bifuncionales, que forman entrecruzamientos intra e intercatenarios. La ciclofosfamida, el busulfano y las nitrosoureas son agentes alquilantes. El cisplatino, muy útil en el tratamiento del cáncer testicular, entrecruza el DNA. Los agentes alquilantes son citotóxicos y también mutagénicos, y a veces provocan cánceres secundarios como la leucemias.

Terminación de la replicación en los genomas circulares

La terminación de la replicación de un genoma circular generalmente ocurre a 180º del origen. Se encuentran dos horquillas de replicación convergentes, y se sintetiza la última porción del genoma. Es necesario desenlazar topológicamente los dos nuevos cromosomas. Esta es una de las funciones básicas de las topoisomerasas de tipo II. En algunos virus pequeños, como el SV40, la terminación ocurre en cualquier lugar donde se encuentren las horquillas de replicación; no está implicada ninguna secuencia en particular. El genoma de *E. coli* contiene secuencias especiales de terminación que restringen la replicación dentro de una región, impidiendo que las horquillas de replicación prosigan.

Terminación de la replicación en los genomas lineales

Las células humanas y las células eucarióticas en general tienen cromosomas lineales. Hay dificultades especiales para replicar los extremos de los cromosomas lineales. ¿Cuál es exactamente el problema para replicar los extremos de los cromosomas lineales? Aunque la hebra continua puede teóricamente sintetizarse hasta el mismo extremo de su molde, la hebra rezagada no puede hacerlo. No hay lugar en el extremo opuesto del molde para sintetizar un cebador al cual se puedan añadir los nucleótidos (Figura 4.17*a*). Incluso en el caso improbable de que la primasa pudiera empezar en el mismo extremo del molde, la eliminación del RNA dejaría un pequeño hueco. Ello no constituye un problema en una sola generación, pero al cabo de muchos ciclos de replicación de los cromosomas puede provocar un acortamiento de los extremos y la pérdida de genes esenciales que conduzca a la muerte celular. Por lo tanto un problema esencial es impedir la pérdida continuada de DNA en los extremos de los cromosomas.

Un segundo problema que los eucariotas deben afrontar es la tendencia de los extremos del DNA a desencadenar la recombinación. Para evitar ambos problemas, en los extremos de los cromosomas lineales de los eucariotas se encuentran unas estructuras denominadas **telómeros**, que contienen muchas repeticiones de una secuencia de seis nucleótidos rica en G. Los telómeros humanos contienen millares de copias de la secuencia TTAGGG. El extremo 3′ del cromosoma se extiende unos 18 nucleótidos más allá del extremo 5′ (Figura 4.17*b*), dejando tres repeticiones en este fragmento. El extremo 3′ se pliega sobre sí mismo, formando puentes de hidrógeno G-G no de Watson y Crick, y une proteínas que determinan su longitud y lo protegen de una recombinación excesiva.

Telomerasa

Los telómeros son mantenidos por la **telomerasa**, enzima que añade nuevas repeticiones de seis nucleótidos al extremo 3′ de los telómeros. Las telomerasas son complejos ribonucleoproteicos que contienen un pequeño RNA que sirve de molde para la adición de una nueva repetición de seis nucleótidos (Figura 4.18). La telomerasa se une al extremo de la hebra 3′ por puentes de hidrógeno entre el pequeño

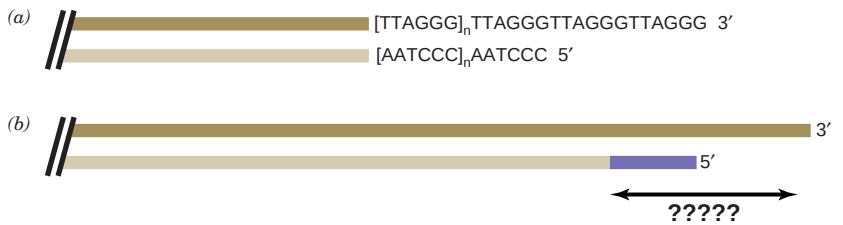


FIGURA 4.17
Telómeros humanos.
(*a*) Un telómero consiste en muchas repeticiones en tándem de una secuencia de 6 nucleótidos, con la cadena rica en G prolongada 12-18 nucleótidos más allá de la cadena rica en C. (*b*) El problema de la replicación de los telómeros. El extremo 3′ de una hebra parental, que sirve de molde para la síntesis de la hebra hija discontinua, se representa de color oscuro; la hebra hija se muestra en color claro, y el cebador de RNA en púrpura. El problema consiste en la falta de espacio para sintetizar un cebador que permitiera completar la hebra hija (región indicada con ????) y, por tanto, la hebra hija será más corta que la hebra parental. La eliminación del último cebador de RNA la hace todavía más corta.

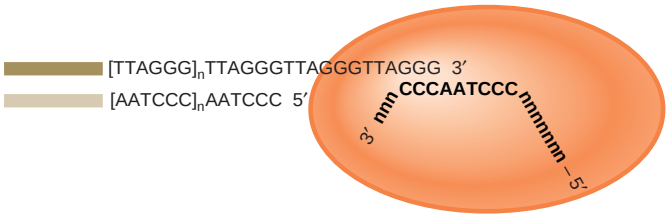


FIGURA 4.18
La telomerasa.
La telomerasa es un enzima que cataliza la adición de nuevas repeticiones teloméricas de 6 nucleótidos al extremo 3′ de una cadena de DNA. La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico del que es parte integrante un corta cadena de RNA. El RNA de la telomerasa sirve de molde para la reacción, mientras que el componente proteico actúa como transcriptasa inversa y sintetiza DNA usando el RNA de molde. Después de añadir una repetición de 6 nucleótidos, el enzima puede disociarse y unirse de nuevo y añadir repeticiones de 6 nucleótidos adicionales.

RNA y los últimos nucleótidos de la hebra. Se sintetiza una nueva repetición de seis nucleótidos usando el RNA de molde. La telomerasa se disocia y se reasocia para añadir otro hexámero. Hay un equilibrio entre el acortamiento de las hebras rezagadas debido a problemas en la replicación (Figura 4.19) y la adición de nuevas repeticiones de seis nucleótidos (Figura 4.20).

No es necesario que los telómeros mantengan la misma longitud; un cierto acortamiento no constituye un problema porque las repeticiones no codifican proteína. Los telómeros sufren ciclos de acortamiento y de adición de nuevas repeti-

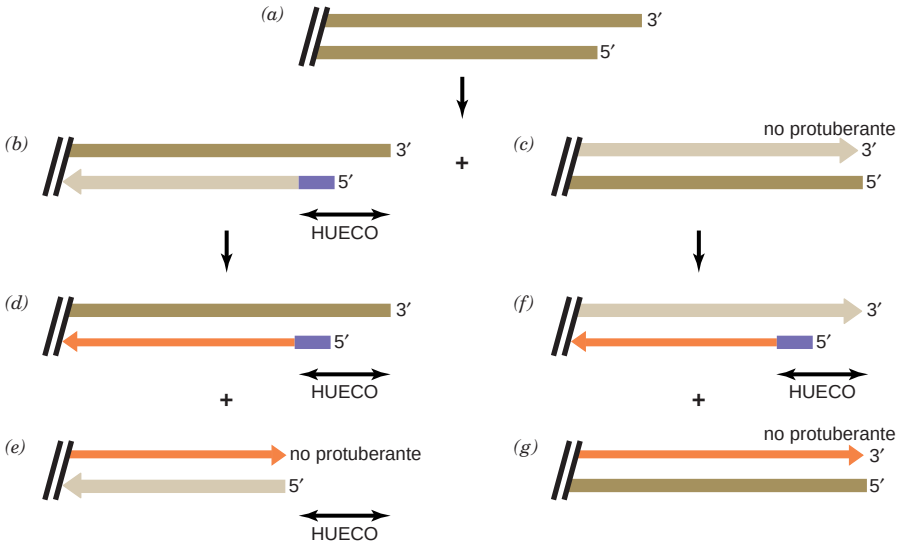


FIGURA 4.19
Replicación en ausencia de telomerasa.
(*a*) Extremo de un cromosoma con un extremo 3′ protuberante. (*b*, *c*) Productos del primer ciclo de replicación. (*b*) El proceso normal de replicación no puede terminar la hebra discontinua. (*c*) La otra hebra parental puede servir de molde hasta el final y, por tanto, no hay acortamiento, pero no queda el extremo 3′ protuberante. (*d*, *e*) Productos de la segunda ronda de replicación de la molécula (*b*). En la siguiente generación, la hebra original de (*a*) tiene el mismo problema que el mostrado en (*b*). (*e*) La hebra hija más corta (*b*) puede ser completada hasta el extremo del DNA (el cebador, representado por una línea gruesa, ha sido eliminado por la RNasa H y la FEN1). El resultado es un cromosoma más corto con extremos romos. (*f*, *g*) Los productos de la segunda ronda de replicación de la molécula mostrada en (*c*). (*f*) Molde de la hebra discontinua (la hebra recién sintetizada en (*c*) tiene los mismos problemas que la (*b*)); el resultado es un mayor acortamiento. (*g*) La otra hebra parental puede servir de molde hasta su extremo y,, por tanto, no hay acortamiento, pero tampoco solapamiento. A medida que este ciclo se repite, una de las hebras se acorta progresivamente y se va perdiendo el extremo 3′ protuberante.

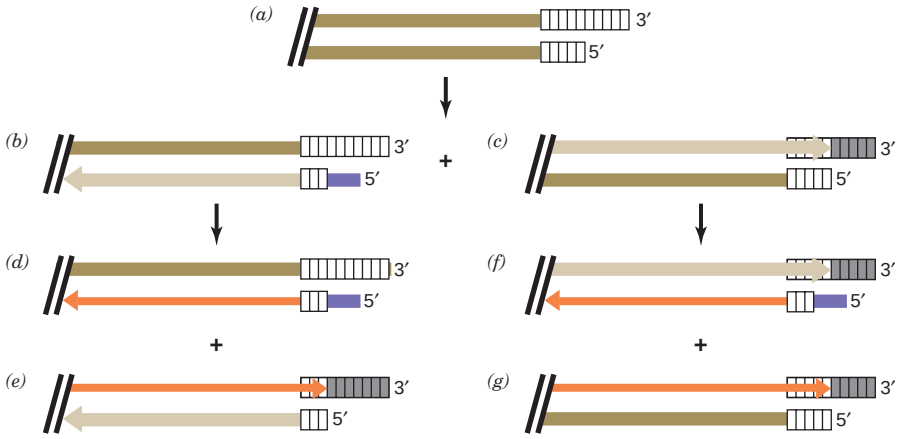


FIGURA 4.20
Replicación con telomerasa.
(a) Extremo de un cromosoma, con el extremo protuberante y las repeticiones teloméricas representadas por cajas. *(b, c)* Productos de la primera ronda de replicación. *(b)* El proceso normal de replicación no puede terminar la hebra discontinua. La región que no se ha completado está formada por repeticiones teloméricas no codificadoras. *(c)* La otra hebra parental puede servir de molde hasta el mismo extremo, por lo tanto, no hay acortamiento, pero tampoco solapamiento. Sin embargo, la telomerasa puede añadir nuevas subunidades al extremo 3′ (cajas oscuras), que restablecen el solapamiento. *(d, e)* Productos de la segunda ronda de replicación de la molécula en *(b)*. *(d)* En la siguiente generación la hebra original de *(a)* tiene el mismo problema que aparece en *(b)*. *(e)* La hebra hija más corta en *(c)* puede completarse hasta el extremo del DNA (el cebador, representado por una línea gruesa, ha sido eliminado por la Rnasa H y FEN1). El resultado es un cromosoma más corto con extremos romos. Sin embargo, la telomerasa puede añadir nuevas subunidades al extremo 3′ (cajas oscuras), que alargan la hebra y restablecen el solapamiento. Por lo tanto, no hay acortamiento progresivo. *(f, g)* Productos de una segunda ronda de replicación de la molécula en *(c)*. *(f)* El molde para la hebra discontinua [hebra recién sintetizada en *(c)*] tiene el mismo problema que la de *(b)*; el resultado es un acortamiento todavía mayor. *(g)* La otra hebra parental puede servir de molde hasta el mismo extremo, por lo tanto no hay acortamiento, pero tampoco solapamiento. Sin embargo, la telomerasa puede añadir nuevas subunidades al extremo 3′ (cajas oscuras), restableciéndose así el solapamiento. La telomerasa impide el acortamiento progresivo y preserva el extremo 3′ protuberante en los sucesivos ciclos.

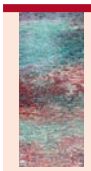
ciones por la telomerasa. Aunque la longitud de los telómeros no permanezca constante, se evita el acortamiento progresivo añadiendo nuevas repeticiones. Las telomerasas también restablecen el fragmento de cadena sencilla en el extremo 3′.

Las células diferenciadas que ya no se dividen, o que tienen que dividirse sólo un número limitado de veces, no expresan la telomerasa. La expresión de la telomerasa suele reactivarse en las células tumorales, lo que les permite dividirse indefinidamente sin acortamiento de los cromosomas. Esta característica convierte a la telomerasa en una diana para la quimioterapia del cáncer. Hay que señalar que la inactivación de la telomerasa no provocaría en ningún caso la rápida detención del crecimiento tumoral; cualquier efecto se demoraría muchos ciclos celulares.

Replicación de los genomas de RNA

Algunos virus tienen el genoma de RNA. Estos genomas son replicados con mucha menor fidelidad y pueden acumular variaciones con relativa rapidez. Un ejemplo de este tipo particularmente destacable es el virus de la **inmunodeficiencia humana (VIH)** que provoca el **SIDA** (Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida; véase la Apli. Clín. 4.3).

La rápida aparición de variantes debido a la reducida fidelidad de la replicación del genoma de RNA da lugar a la aparición de una colección de virus en un individuo. Una pequeña fracción de estas variantes probablemente sea resistente a cualquiera de los fármacos usados para tratar la infección. Estos virus pueden crecer en presencia del agente terapéutico y por lo tanto ser seleccionados con la consiguiente pérdida de eficacia del fármaco. Las terapias combinadas están diseñadas



APLICACIÓN CLÍNICA 4.3

Los análogos de los nucleósidos y la resistencia a los fármacos en la terapia contra el VIH

El SIDA (síndrome de la inmunodeficiencia adquirida) está causado por infección con el retrovirus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Un paso esencial en el ciclo vital de este virus es la síntesis, catalizada por una transcriptasa inversa, de una copia de DNA del genoma de RNA del virus. La transcriptasa inversa es una de las principales dianas de la quimioterapia.

El AZT (3′-azido-2′,3′-didesoxitimidina; Zidovudine) fue el primer fármaco autorizado para el tratamiento de las infecciones por VIH. Es un análogo de los nucleósidos, con un grupo azido en el azúcar. Puede ser fosforilado hasta la forma trifosfato y compite con el dTTP para incorporarse en el transcrito inverso. Una vez incorporado, interrumpe la extensión de la cadena porque el grupo azida en el carbono 3′ no sirve de sustrato para la adición de nucleótidos. El AZT es mucho menos eficiente cuando compite con las DNA polimerasas celulares, mucho más precisas; su efecto terapéutico se ejerce, pues, principalmente sobre la replicación del virus. Sin embargo, se presentan efectos secundarios, entre los cuales se encuentran la toxicidad sobre la médula ósea, que contiene células en rápida división, y la miopatía, que puede deberse a los efectos tóxicos sobre las mitocondrias, que poseen su propia DNA polimerasa, la pol γ.

Se han usado también otros análogos de los nucleósidos en el tratamiento de la infección por VIH. El DDI (2′,3′-didesoxiinosina; didanosine) y la didesoxicitidina (zalcitabine) también funcionan como terminadores de la cadena tras la incorporación de sus derivados trifosforilados por la transcriptasa inversa. Las transcriptasas inversa no poseen actividad correctora; por lo tanto, su tasa de error es mucho más alta que la de las DNA polimerasas celulares. Esta elevada tasa de error complica el tratamiento del SIDA porque la población de virus de cualquier paciente contiene muchos mutantes. Algunos de estos mutantes probablemente sean resistentes a cualquier agente terapéutico. Así, muchos fármacos reducen inicialmente la carga vírica, pero más tarde se vuelven ineficaces debido al crecimiento selectivo de virus cuya diana terapéutica haya mutado. La terapia combinada con varios fármacos que actúan sobre diversas proteínas víricas es un intento de paliar el problema.

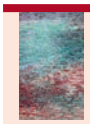
para reducir la probabilidad de que un virus sea resistente a todos los fármacos de la combinación. Las terapias combinadas actuales actúan a la vez sobre la transcriptasa inversa que sintetiza copias de DNA del genoma de RNA (que hace posible la integración en el genoma de las células) y sobre la proteasa del VIH.

Secuenciación del DNA

El Proyecto Genoma Humano tiene por objetivo determinar la secuencia completa del genoma humano, así como de otros organismos modelo importantes: *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panificación), *Caenorhabditis elegans* (un nemátodo que ha sido muy usado en estudios de desarrollo y envejecimiento), *Drosophila melanogaster* (la mosca del vinagre) y *Mus musculus* (ratón). Otros objetivos son la elaboración de mapas físicos y genéticos, el desarrollo de métodos para secuenciar y analizar las secuencias y examinar la implicaciones éticas, legales y sociales derivadas de la disponibilidad de estas secuencias. Hacia el verano del año 2000 la mayoría de estos objetivos se habían alcanzado o superado, y cerca del 90% de las secuencias del genoma se encontraba disponible en forma de fragmentos todavía sin ordenar (véase la Apli. Clín. 4.4).

La secuenciación del DNA se basa en dos aspectos básicos de la síntesis del DNA: el requerimiento de cebadores por parte de las DNA polimerasas y la química de la adición de nucleótidos a una cadena de DNA en crecimiento (véase la Figura 4.2). La idea clave consiste en la síntesis de un conjunto anidado de cadenas de DNA, que comiencen todas en el extremo 5′ del cebador y que terminen al añadir uno de los cuatro nucleótidos. El conjunto anidado se separa por electroforesis. La secuencia puede leerse a partir del patrón de longitudes.

Los fragmentos de DNA para secuenciar se clonan en un sitio específico de un vector plasmídico. Como cebador universal se usa un oligonucleótido sintético complementario de la secuencia del plásmido, con el extremo 3′ cerca del punto de inserción del fragmento (Figura 4.21). En el método de secuenciación usado en el proyecto del genoma humano, la terminación específica ocurre como consecuencia de la incorporación de **didesoxirribonucleótidos** (ddNTP; Figura 4.21), cada uno marcado con un colorante fluorescente distinto. Los ddNTP pueden incorporarse a la cadena en crecimiento como cualquier dNTP normal, pero al carecer de un 3′-OH no puede añadirse otro nucleótido al extremo de la cadena. Como consecuencia, se produce la terminación específica de la elongación de la cadena después de la incorporación de ddA, ddC, ddG o ddT. Se usa una mezcla de ddNTP y dNTP, cuya proporción dé lugar a una incorporación de ddNTP con una probabilidad del 0,5% en cada sitio. Se produce un conjunto anidado de fragmentos que comparten un extremo



APLICACIÓN CLÍNICA 4.4
El Proyecto Genoma Humano

El Proyecto Genoma Humano es un gran esfuerzo internacional cuyo propósito es determinar la secuencia completa de los 3 200 000 000 pb del genoma humano. Pero su importancia va mucho más allá. Otros objetivos son la elaboración de mapas físicos y genéticos del genoma, la secuenciación del genoma de organismos modelo, el desarrollo de técnicas de secuenciación y de informática para analizar la secuencia, la formación de científicos en este campo y la exploración de las implicaciones éticas, legales y sociales de los datos.

Los mapas genéticos y físicos tienen ya una gran importancia en la investigación dirigida a encontrar genes que contribuyen al riesgo de sufrir enfermedades. La secuenciación paralela de organismos modelo permite estudios comparativos que pueden ayudar a determinar las funciones potenciales de los genes que se han descubierto. Los organismos modelo que se estudiaron inicialmente fueron *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panificación), el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* y el ratón. Se trata de organismos de los cuales se poseen muchos conocimientos. La levadura es un eucariota simple que ha sido muy utilizado en estudios de la replicación, la reparación y la recombinación, así como en la regulación del ciclo celular. Muchos de los resultados de este capítulo proceden de estudios en levadura. El nemátodo *C. elegans* es un animal relativamente sencillo, en el cual se ha determinado el destino de cada una de sus células durante el desarrollo. Drosophila es un organismo más complejo que ha sido importante en los estudios de genética y desarrollo durante todo el siglo XX. El ratón es un mamífero cuyo desarrollo, fisiología y comportamiento tiene muchos puntos en común con los humanos. La posibilidad de manipular los ratones genéticamente hace posible desarrollar modelos animales de las enfermedades humanas. El proyecto está muy avanzado y se ha extendido a otros organismos modelo y al estudio de la variación de la secuencia (polimorfismos; véase la Apli. Clín. 4.5). La disponibilidad de la secuencia del genoma humano (y de otros organismos) ya está teniendo un gran impacto en la ciencia y en la medicina. Pero sólo es el primer paso. Queda mucho camino por recorrer en la comprensión de la masa de datos que se ha generado. Estos datos también han generado problemas sobre la privacidad y la discriminación que deben ser evaluados cuidadosamente.

Collins, F. S., Patrinos, A., Jordan, E., Chakravarti, A., Gesteland, R., Walters, L., and members of the DOE and NIH planning groups. New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998–2003. *Science* 282:682, 1998.

conocido, mientras que el otro es específico de base (Figura 4.21). Los fragmentos de DNA se separan por electroforesis, con una resolución de un nucleótido. Los diferentes marcadores fluorescentes se detectan mediante instrumentos que permiten la lectura automática de la secuencia.

Los datos procedentes del proyecto del genoma humano tendrán enormes implicaciones en la compresión del funcionamiento de las células y los organismos y en la medicina. Las diferencias individuales de la secuencia influyen en el riesgo de sufrir enfermedades, en el metabolismo y en la respuesta a los fármacos. El conocimiento de las diferencias individuales de la secuencia del DNA permitirá detectar

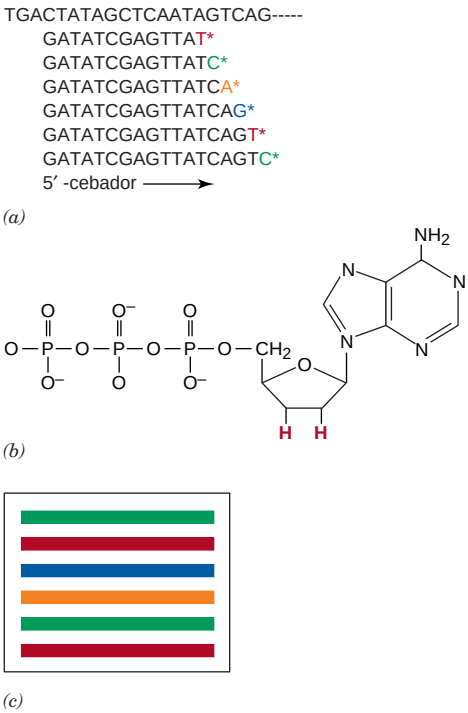
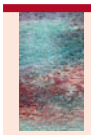


FIGURA 4.21
Secuenciación del DNA.
(*a*) Fragmentos anidados. El DNA es sintetizado mediante la extensión de un oligonucleótido cebador. La síntesis de una fracción de las cadenas finaliza después de la adición de cada uno de los ddNTP (el asterisco indica que el ddNTP es fluorescente y puede ser detectado). El resultado es un conjunto anidado de fragmentos todos con el mismo extremo 5′ (extremo 5′ del cebador) y con extremos 3′ específicos de base. (*b*) 2′, 3′-Didesoxirribonucleótido: ddATP. El 5′ trifosfato de un ddNTP es idéntico al de un dNTP normal, por lo que un ddNTP puede ser incorporado a la cadena de DNA en crecimiento como se muestra en la Figura 4.2. Sin embargo, no hay 3′-OH al cual pueda añadirse un nuevo nucleótido, por tanto la cadena termina después de la adición de un ddNTP. (*c*) La separación electroforética del conjunto anidado de fragmentos y la detección del colorante fluorescente específico asociado a cada longitud (un colorante diferente para cada nucleótido) permite la lectura automatizada de las secuencias desde la base (fragmento más pequeño) hacia arriba.



APLICACIÓN CLÍNICA 4.5
Medicina genómica

El genoma de los diferentes individuos presenta sutiles diferencias. Aproximadamente cada 1000 pb hay una diferencia, denominada polimorfismo. La mayoría de los polimorfismos no afectan a las funciones celulares, pero otros contribuyen a las muchas diferencias que pueden observarse. Algunos afectan a la susceptibilidad a algunas enfermedades, algunos al metabolismo de fármacos y otros compuestos (farmacocinética) y otros a la respuesta a estos fármacos (farmacodinamia).

La tarea de secuenciar el genoma humano va acompañada de un esfuerzo considerable para encontrar y catalogar los polimorfismos. Cuanto más se conozca sobre los efectos de estas diferencias de secuencia sobre las enfermedades y su tratamiento, mejor adaptada estará la medicina a las diferencias individuales. Ya se dispone de la tecnología necesaria para determinar rápidamente qué polimorfismos están presentes en sitios específicos del genoma de un individuo. Cuando estas técnicas se hagan más baratas y más rutinarias, la determinación de los alelos de genes clave formará parte de la rutina del diagnostico y de la planificación del tratamiento. Por ejemplo, hay diferencias significativas entre individuos en la velocidad con que son metabolizados los fármacos. Si se prescribe una dosis estándar sobre la base del peso corporal, puede ser demasiado baja para ser efectiva en individuos que metabolicen el fármaco rápidamente, pero puede ser tóxica para aquellos que lo metabolicen muy lentamente. La determinación rutinaria de los polimorfismos implicados podría hacer posibles terapias más eficaces y con menos efectos secundarios.

las enfermedades en una fase más temprana y diseñar tratamientos adaptados a cada paciente (véase Apli. Clín 4.5).

4.3 RECOMBINACIÓN

La recombinación es el intercambio de información genética. Hay dos tipos básicos de recombinación, la **recombinación homóloga** y la **recombinación no homóloga**. La primera (también llamada **recombinación general**) tiene lugar entre secuencias idénticas o casi idénticas, por ejemplo, entre los cromosomas paternos y maternos de una pareja. Los cromosomas no se transmiten intactos de generación en generación (Figura 4.22); más bien, el cromosoma heredado del padre contiene porciones procedentes de sus dos progenitores. Ello forma parte del proceso normal de alineamiento y segregación de los cromosomas, necesario para asegurar que cada célula germinal reciba un solo conjunto haploide de cromosomas durante la meiosis. Esta recombinación es recíproca, pues transfiere parte de un cromosoma a otro y viceversa. Baraja la combinación de genes antes de que pasen a la generación siguiente, generando diversidad genética. La probabilidad de recombinación entre dos puntos cualesquiera de un cromosoma es aproximadamente proporcional a la distancia física que los separa. Este es el fundamento de los mapas genéticos. Una frecuencia de recombinación de un 1% entre dos genes o marcadores se define como una distancia genética de 1 **centimorgan** (**cM**). En humanos 1 cM equivale a 1 000 000 de pares de bases a lo largo del cromosoma.

La recombinación también es importante para la replicación y la reparación del DNA. Hay tres modelos principales de recombinación homóloga. Tienen muchos aspectos en común y comparten un intermediario, denominado **unión de Holliday**. El modelo de Holliday es el más sencillo, y su comprensión facilita el análisis de los demás.

El modelo de Holliday

Las características fundamentales del **modelo de Holliday** son (1) homología, (2) simetría de los dos cortes y de la invasión de las hebras, y (3) presencia de una unión de Holliday de cuatro cadenas como intermediario clave (Figura 4.23). En este modelo, la recombinación comienza con cortes de cadena sencilla en posiciones homólogas en los dos dúplex de DNA alineados. Las hebras de cada dúplex se desenrollan parcialmente y cada una de ellas "invade" el dúplex opuesto. Es decir, una porción de una de las hebras de cada uno de los dúplex se aparea con el dúplex opuesto de forma recíproca y simétrica. Estas hebras pueden unirse covalentemente al dúplex opuesto, creando una molécula híbrida en la cual dos hebras entrecruzan las moléculas de DNA. A continuación se produce la **migración de las ramas**. La migración de las ramas exige el desenrollamiento y el enrollamiento simultáneos de los dos dúplex, de forma que el número total de puentes de hidrógeno permanezca constante aunque la posición del entrecruzamiento varíe. Este proceso requiere poca energía, pues el número de puentes de hidrógeno permanece constante. La migración de las ramas crea una región de

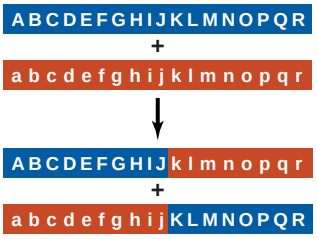


FIGURA 4.22
Recombinación homóloga.
(a) El cromosoma paterno se muestra en azul con los alelos en letra mayúscula. El cromosoma materno homólogo se muestra en rojo con los alelos en letra minúscula. *(b)* Después de la recombinación homóloga (entre los genes j y k) ambos cromosomas contienen DNA de ambos padres. Ha habido un intercambio igual entre ellos.

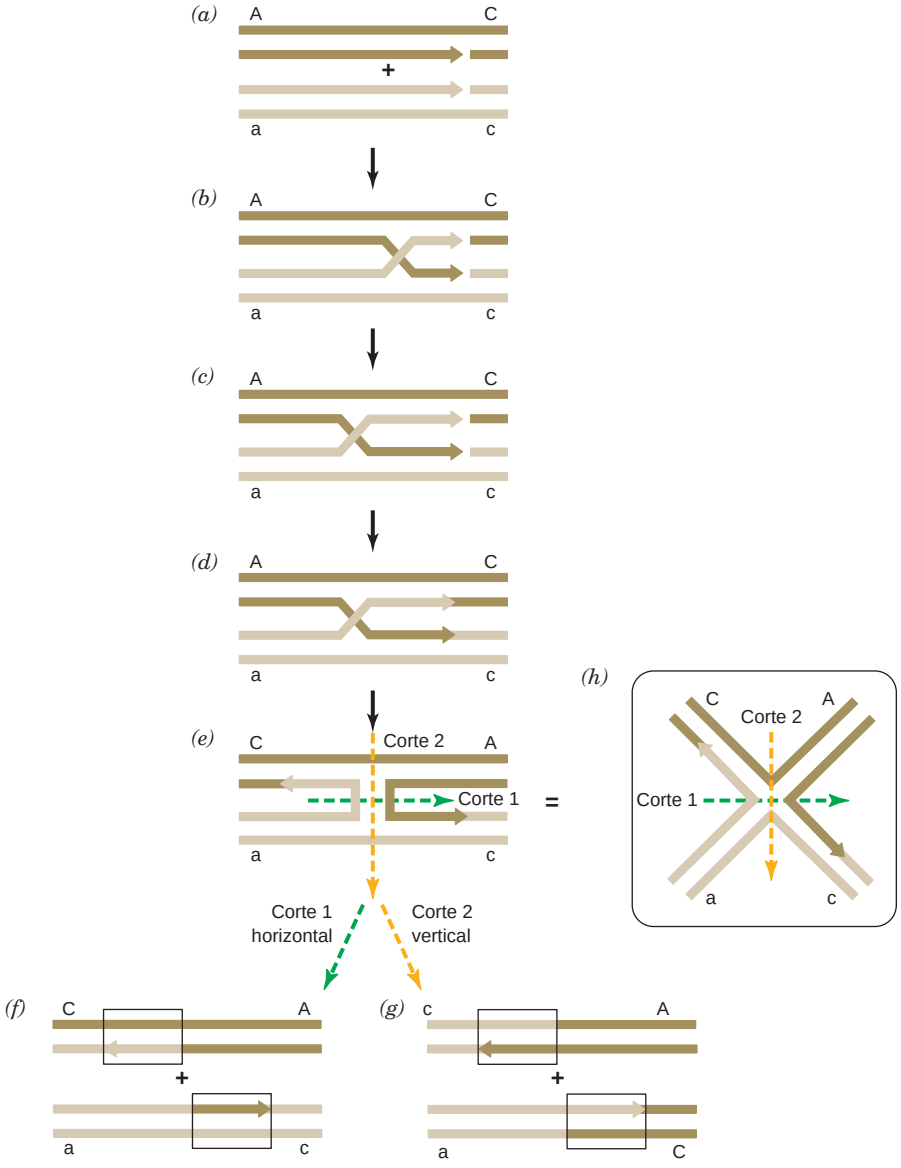


FIGURA 4.23
Modelo de Holliday de recombinación homóloga.
(*a*) Sinapsis (apareamiento): dos moléculas homólogas de DNA se juntan correctamente alineadas. (A,a y C,c representan diferentes alelos de un gen o de un marcador a ambos lados del entrecruzamiento). Se realizan cortes de cadena sencilla en posiciones homólogas en las hebras de la misma polaridad. (*b*) Las hebras se desenrollan parcialmente e "invaden" recíprocamente (apareamiento de bases) la molécula opuesta, formando una estructura en la cual dos hebras intactas están unidas por dos hebras entrecruzadas. Es una operación simétrica y recíproca. Las regiones en las cuales una hebra es de un dúplex y la otra del dúplex homólogo se denominan heterodúplex. (*c*) Se produce la "migración de la rama"; el desenrollamiento y el enrollamiento se producen simultáneamente, por lo tanto no hay cambio neto en la cantidad de pares de bases, pero la posición del entrecruzamiento se mueve, formándose más DNA heterodúplex. (*d*) La DNA ligasa sella la mella del DNA. La migración de las ramas puede extenderse. Las cuatro hebras se mantienen juntas en el punto de entrecruzamiento. (*e*) La rotación de la molécula forma un "intermediario de Holliday", que se muestra en el recuadro (*h*). (*f, g*) Separación: las moléculas se separan mediante dos cortes en una cualquiera de dos direcciones (flechas). Los extremos son empalmados por la ligasa. La dirección del corte determina si las regiones flanqueantes son intercambiadas. (*f*) Si se cortan las hebras entrecruzadas (corte 1, horizontal) los genes flanqueantes o los marcadores permanecen donde estaban (AC/ac). No se detectaría recombinación entre estos loci. (*g*) Si se cortan las hebras parentales intactas (corte 2, vertical) se intercambian los genes o los marcadores flanqueantes (Ac/aC). Esta situación se detectaría como recombinación. Obsérvese que en ambos casos hay una región de heterodúplex (encuadrada). La reparación de apareamientos incorrectos puede dar lugar a conversión génica.

heterodúplex, es decir, una región donde una hebra procede del dúplex original y otra hebra del otro dúplex. En humanos, donde dos individuos difieren aproximadamente en un par de bases de cada mil, una región de heterodúplex probablemente contenga al menos un par de bases desapareado. Los dos dúplex de DNA unidos por un único entrecruzamiento pueden girar, tal como se muestra en la Figura 4.23, para crear una unión de Holliday de cuatro cadenas. La separación de la unión de Holliday en dos dúplex puede ocurrir por cualquiera de los dos procedimientos representados en la Figura 4.23*f-h*. Si se cortan las hebras cruzadas (corte 1), los marcadores que flanquean la región del heterodúplex permanecen ligados con la misma fase de origen; en términos generales, los dos cromosomas permanecen intactos. Si se cortan las hebras intactas (corte 2), las regiones flanqueantes se intercambian entre los dos cromosomas, creándose un nuevo cromosoma con una parte procedente de un progenitor y una parte de otro. El heterodúplex puede experimentar reparación de los desapareamientos (véase más adelante), que convierte un alelo en otro, proceso denominado **conversión génica**.

El modelo de Meselson-Radding

Una vez comprendido el modelo de Holliday es fácil entender la variante propuesta por Meselson y Radding. Se inicia con un corte único y una sola hebra invasora, en

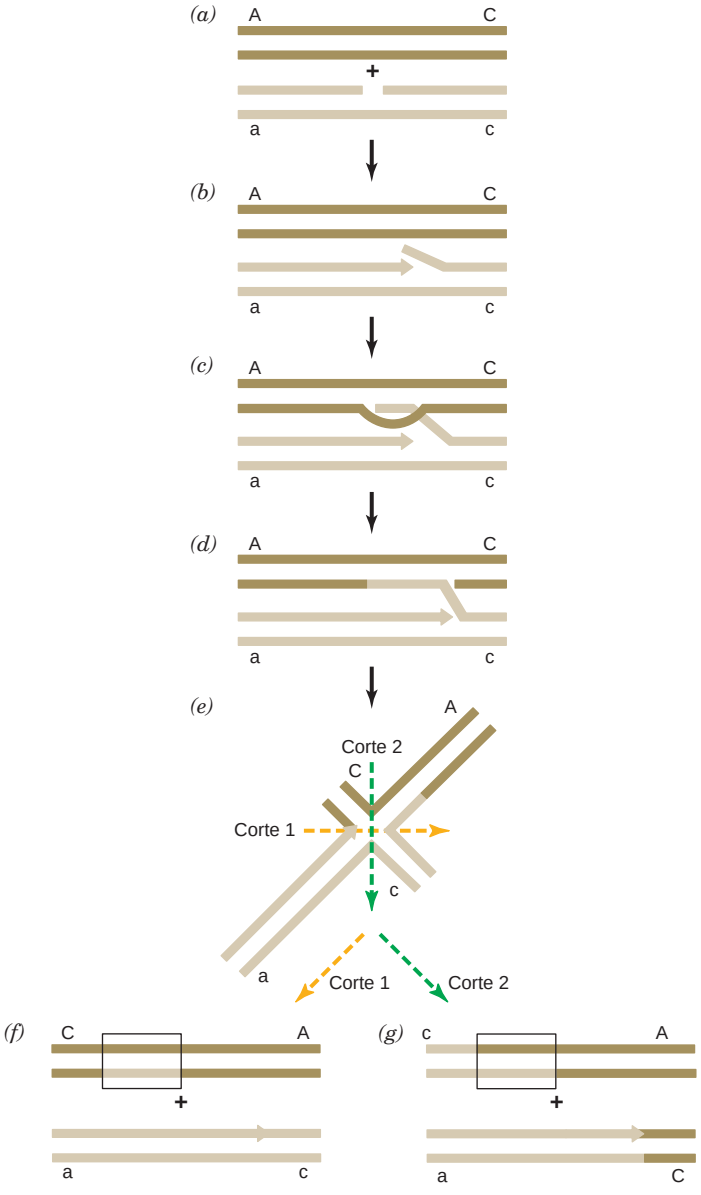


FIGURA 4.24
Modelo de Meselson-Radding de recombinación homóloga. Este modelo es similar al de Holliday, pero la iniciación es mediante un único corte y una sola hebra invasora. (*a*) Sinapsis (apareamiento): dos moléculas de DNA homólogas se unen alineadas correctamente. Se corta una de las hebras. (*b*) El extremo 3′-OH es elongado por una DNA polimerasa, desplazando el extremo 5′. (*c*) El extremo 5′ libre invade el dúplex homólogo, formando un "bucle D". (*d*) El bucle D es degradado y la síntesis de reparación y el empalme con DNA ligasa dan como resultado una molécula en la cual una hebra cruza entre los dos dúplex. La migración de la rama se produce cuando continúa la elongación de una de las hebras (no mostrado). La hebra en crecimiento cruza al otro lado y se une al dúplex opuesto, dejando las cuatro hebras unidas en un único punto de entrecruzamiento, como en la Figura 4.23. (*e*) Las hebras rotan para formar una unión de Holliday, exactamente como en la Figura 4.23*e*, *h*. La separación de la unión de Holliday puede producirse de dos maneras, como se muestra en la Figura 4.23. La dirección de los cortes determina si se produce el intercambio de las regiones flanqueantes. (*f*) Si se cortan las hebras cruzadas (corte 1, horizontal) los marcadores de los flancos permanecen donde estaban (AC/ac). No se detectaría recombinación entre estos marcadores. (*g*) Si se cortan las hebras parentales intactas (corte 2, vertical), se intercambian los marcadores de los flancos (Ac/aC). Esta situación se detectaría como recombinación. Obsérvese que en ambos casos hay una región de heterodúplex (recuadrada), pero no es recíproca, se encuentra sólo en un dúplex; la reparación de apareamientos erróneos puede causar conversión génica en esta región.

lugar de una pareja de cortes e invasión recíproca (Figura 4.24). La hebra mellada sirve a la vez de molde y de cebador para una DNA polimerasa, y esta elongación desplaza parte de la hebra. La hebra desplazada invade el dúplex opuesto alineado, formando una estructura denominada bucle D. La porción de cadena sencilla del bucle D se degrada y la síntesis de reparación y la ligación resultan en el cruce de una de las hebras. A continuación se produce la migración de la rama. La mella restante es empalmada y las hebras pueden pivotar para formar una unión de Holliday idéntica a la descrita anteriormente. La unión de Holliday puede separarse exactamente como se ha descrito para el modelo de Holliday, con el resultado del intercambio de marcadores flanqueantes (corte 2) o del restablecimiento de la configuración original (corte 1). La principal diferencia del **modelo de Meselson-Radding** es el heterodúplex asimétrico que resulta de la invasión por una hebra de uno de los dos dúplex. La reparación de los desapareamientos puede dar lugar a conversión génica, como en el caso anterior.

Modelo del corte de doble cadena

El tercer modelo es el del corte de doble cadena. En éste, la recombinación comienza con un corte de doble cadena en uno de los dúplex (Figura 4.25). Los extremos son recortados con pérdida de información genética de uno de los dos dúplex. Hay formas alternativas de este modelo. En una, los dos fragmentos de cadena sencilla del dúplex cortado invaden el dúplex intacto, formando una sola molécula con dos uniones de Holliday. Los extremos cortados pueden repararse por una polimerasa, usando la hebra intacta como molde y una DNA ligasa. La migración de las ramas tiene lugar como en los modelos anteriores. Se ha propuesto un modelo alternativo en el cual el extremo 3′ de uno solo de los dos lados del corte invade la otra cadena y forma un bucle D que hace posible la copia del dúplex intacto. Ello puede dar lugar a la formación de una pequeña burbuja de replicación con síntesis en ambas cadenas por una corta distancia, y a la separación cuando la burbuja alcanza el otro lado del corte. Este proceso daría lugar a conversión génica masiva.

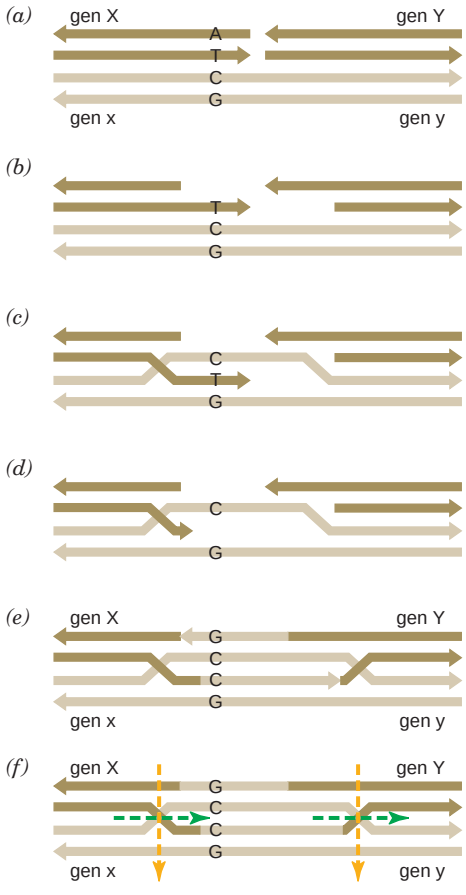


FIGURA 4.25
Modelo de la recombinación homóloga del corte de doble cadena. Este modelo es parecido en muchos aspectos a los dos modelos descritos anteriormente, pero la iniciación es mediante un corte de doble cadena en uno de los dos DNA. (*a*) La iniciación es mediante un corte de doble cadena en una de las moléculas de DNA. Se muestran dos dúplex alineados, con diferentes alelos de los genes flanqueantes (X,x;Y,y). También se muestra una posición en la cual un dúplex tiene un par de bases AT y el otro un par de bases GC. (*b*) El DNA es recortado a partir del corte por una exonucleasa que deja extremos 3′-OH protuberantes. Esta reacción puede eliminar uno de los nucleótidos que difiera entre las dos hebras. (*c*) Uno o ambos extremos protuberantes puede invadir el dúplex homólogo intacto. (*d*) Donde haya un desapareamiento, el extremo libre puede ser recortado todavía más por enzimas de reparación de apareamientos incorrectos. (*e*) El extremo libre puede ser extendido por una DNA polimerasa, con resultado de conversión génica, puesto que el molde procede de uno de los dos dúplex. Las mellas restantes son reparadas y se forman dos uniones de Holliday. (*f*) A continuación se separan ambas uniones de Holliday. Al haber dos uniones de Holliday y dos maneras de separarlas (comparables a las Figuras 4.22 y 4.23) hay cuatro posibles resultados. Dos de las cuatro posibles maneras de resolver las uniones de Holliday (cortes vertical/vertical u horizontal/horizontal) dejan los marcadores de los flancos como estaban. Las otras dos maneras de resolver las uniones de Holliday dan lugar al intercambio de los marcadores de los flancos. La separación también puede realizarla una topoisomerasa.

La separación de las dos uniones de Holliday se realiza mediante un par de cortes. Al haber dos direcciones posibles para resolver cada unión, hay cuatro posibles resultados (Figura 4.25). Dos dejan los marcadores flanqueantes juntos y dos causan el intercambio de los marcadores flanqueantes. La separación también puede correr a cargo de una topoisomerasa II. Puesto que un dúplex ha perdido DNA en la región del corte, hay una región en la cual la conversión génica es esencial para llenar el hueco.

Principales enzimas de la recombinación

RecA

La principal proteína de la recombinación en *E. coli* es **RecA**, que se une de manera cooperativa al DNA de cadena sencilla sobre el que forma una estructura helicoidal. Esta estructura facilita el apareamiento de la hebra sencilla con el DNA dúplex homólogo para formar una estructura de bucle D de tres hebras. El intercambio de hebras forma DNA heterodúplex tal como se ha descrito. Los eucariotas tienen proteínas homólogas, la versión en levadura se denomina Rad51.

Otras proteínas

RecBCD es un complejo de *E. coli* con múltiples actividades; su función en la recombinación es unirse a un corte de doble cadena y transformarlo en un sustrato para la recombinación. RecBCD se mueve a lo largo del DNA y cuando encuentra una secuencia especial, denominada sitio **X**, deja una hebra sencilla protuberante a con un 3′-OH y a la que se une RecA. **RuvA** y **RuvB** forman un complejo con actividad DNA helicasa que cataliza la migración extensiva de la rama. RuvC es una endonucleasa que se une a este complejo y cataliza la separación de las uniones de Holliday.

DNA-PK

En las células de mamíferos, la proteína heterodimérica, denominada Ku, se une con gran afinidad a los extremos del DNA. **Ku** es una **ATPasa dependiente de DNA** con actividad helicasa, que, por lo tanto, puede moverse a lo largo del DNA. Los defectos de Ku producen susceptibilidad a los rayos X y una grave inmunodeficiencia combinada (SCID), porque Ku juega un papel en los procesos de corte y empalme implicados en la génesis de los genes funcionales de las inmunoglobulinas. Ku se asocia con una gran subunidad catalítica para formar la **DNA-PK**, una serina/treonina proteína quinasa dependiente de DNA. Se cree que junta los dos extremos libres del corte y estimula la actividad ATPasa de Ku que desenrolla los extremos hasta que regiones muy cortas (2-6 pb) de "**microhomología**" puedan aparearse. Los extremos no apareados pueden ser eliminados por FEN1, los huecos rellenados por una DNA polimerasa y las mellas empalmadas por la DNA ligasa.

Recombinación no homóloga

Recombinación específica de sitio

En la recombinación específica de sitio, enzimas específicos catalizan la integración de una secuencia en determinados sitios del DNA. La integración del bacteriófago **λ** es el ejemplo mejor estudiado. La **integrasa λ** cataliza el corte específico del DNA de **λ** y de una secuencia especial en el cromosoma de *E. coli*, y también cataliza el empalme posterior. Es un proceso reversible y la secuencia integrada de **λ** puede escindirse del cromosoma. Hay importantes ejemplos de control de procesos mediante recombinación específica de sitio, tales como la conversión del tipo de apareamiento en levadura y el cambio de fase (alteraciones en proteínas de superficie mayoritarias) en los tripanosomas.

Transposición

La **transposición** es el movimiento de trozos específicos de DNA en el genoma. La transposición está catalizada por enzimas específicos al igual que en el caso de la recombinación específica de sitio. Algunos trozos de DNA, denominados **transposones**, tienen dos propiedades clave que les permiten moverse libremente dentro de un cromosoma. Codifican **transposasas** y tienen **secuencias de inserción** que son reconocidas por las transposasas. La transposasa cataliza el proceso de escisión

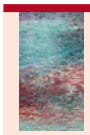
de un lugar del genoma y la inserción en otro lugar, o la inserción replicativa en un nuevo lugar sin abandonar el original. Otros trozos de DNA contienen secuencias de inserción, pero no codifican su propia transposasa, y sólo pueden moverse si se expresa una transposasa en otro lugar.

Los transposones pueden integrarse en otros cromosomas o moverse de un lugar a otro en un cromosoma. Una parte considerable del genoma humano procede de la acumulación de transposones y secuencias de inserción. Los **LINE** (**elementos dispersos largos** de DNA repetitivo, de los cuales L1 es el más común) son transposones de los que hay unas 50 000 copias en el genoma humano. Las secuencias Alu son **SINE** (**elementos dispersos cortos** de DNA repetitivo). En el genoma haploide humano hay unas 500 000 copias de estos elementos, que no codifican una transcriptasa inversa. Algunas mutaciones que provocan enfermedades se deben a la inserción de un transposón en un gen.

Los retrotransposones son secuencias que fueron transcritas como RNA y después transcritas inversamente y de nuevo integradas al azar en el genoma. Los retrovirus producen copias de DNA de su genoma de RNA (utilizando la **transcriptasa inversa**, un enzima que hace copias de DNA a partir de un RNA) y las insertan en el cromosoma del huésped por transposición catalizada por una **integrasa** codificada por el virus.

Recombinación no homóloga (ilegítima)

En la recombinación ilegítima no se necesita homología ni ningún tipo de secuencias especiales. Cuando se introducen genes en células de mamífero, éstos generalmente se integran al azar en los cromosomas por recombinación no homóloga. Este proceso probablemente utilice los enzimas de la reparación/recombinación de cortes de doble cadena. La integración de un fragmento de DNA puede desorganizar genes y causar mutaciones o pérdida de regulación. Esta es la mayor limitación de la terapia génica en la actualidad (Véase la Apli. Clín. 4.6).



APLICACIÓN CLÍNICA 4.6

Terapia génica

La terapia génica consiste en la introducción de genes nuevos o alterados en las células para corregir un defecto genético o tratar una enfermedad. A medida que se conoce más sobre determinadas enfermedades, las posibilidades de intervenir genéticamente aumentan. En algunos casos, se podría en teoría curar la enfermedad reemplazando el gen defectuoso por uno normal. En otros, se podrían construir genes que suministrasen las proteínas ausentes (p. ej., la insulina para los diabéticos) o bien que evitasen los problemas causados por la enfermedad.

Importantes limitaciones impiden progresar. Una de ellas es la dificultad para introducir los genes en las células específicas; para solventarla, se trabaja en vectores para introducir genes y en la biología de las células madre. Otro problema es la tendencia de los genes introducidos a insertarse al azar en el genoma.

El DNA introducido en células de mamífero se integra frecuentemente en el genoma por recombinación no homóloga (ilegítima), probablemente como consecuencia de la reparación de cortes de doble cadena. La inserción al azar del transgén en un lugar no apropiado puede causar nuevas mutaciones por inserción. También puede comprometer la expresión génica a lo largo del tiempo cuando la inserción en una región inadecuada de la cromatina afecta a su regulación.

4.4 REPARACIÓN

Hemos insistido en la importancia de la fidelidad de la replicación del DNA, sin embargo, ésta no es del 100%. Incluso con una tasa de error de 10^{-9}, se introducen un buen número de errores en cada ciclo de replicación. Además, el DNA celular es constantemente alterado por constituyentes celulares, entre los que se encuentran las especies de oxígeno activo, que son subproductos del metabolismo. Muchos agentes medioambientales atacan y modifican al DNA. Por lo tanto, el mantenimiento de la información genética requiere la reparación constante del DNA.

Todos los organismos vivos tienen mecanismos para reparar los daños en el DNA. En esta sección examinaremos algunas de las lesiones más importantes del DNA y los mecanismos para repararlas. Algunas lesiones se reparan directamente, pero la mayoría de ellas son eliminadas del DNA como parte del proceso de reparación. La mayoría de los procesos de reparación aprovechan la naturaleza en doble hebra del DNA, que contiene la información genética por duplicado. Ello permite restablecer la secuencia correcta de la hebra dañada usando la información de la otra hebra.

Lesiones del DNA

En disolución acuosa a 37 ºC se produce la **desaminación** espontánea de las bases C, A y G. La C se desamina a U (Figura 4.26), la A a hipoxantina y la G a xantina. La **despurinación** espontánea por rotura del enlace glucosídico que conecta las purinas a la cadena (dejando la cadena del DNA intacta; Figura 4.26) se produce con una frecuencia relativamente elevada. Se ha estimado que en una célula de mamífero se pierden entre 2000 y 10 000 purinas en 24 horas. Estos sitios despurinados se denominan abásicos (carentes de base) o **sitios AP** (de acuerdo con el significado original de sitios apurínicos, carentes de una purina, posteriormente extendido a la falta de cualquier base).

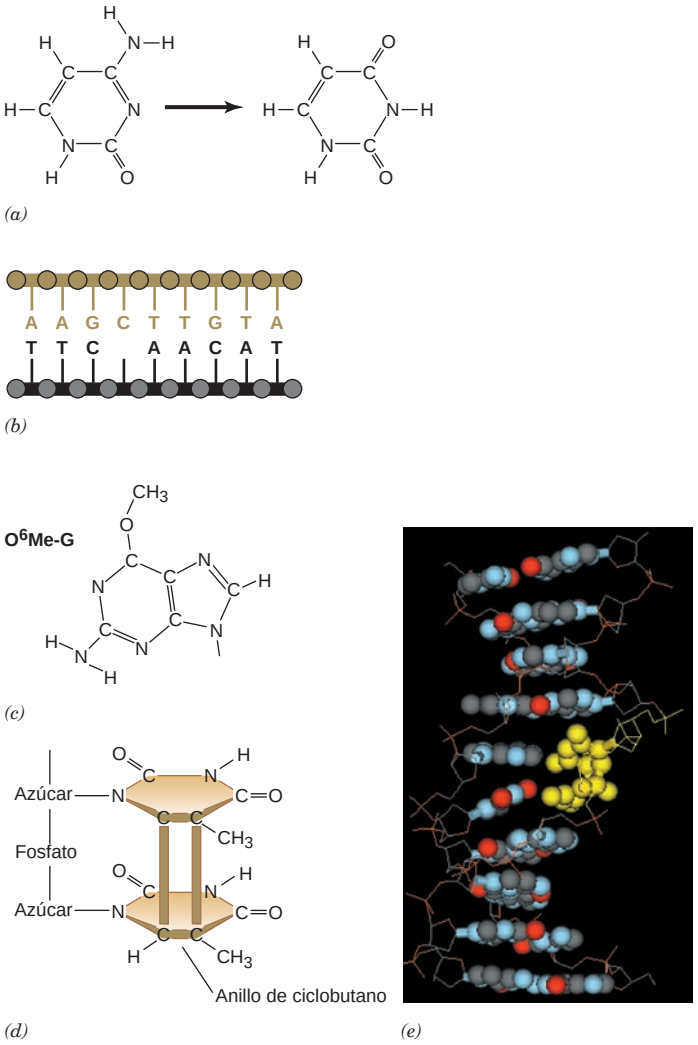


FIGURA 4.26
Lesiones del DNA
(*a*) La desaminación oxidativa convierte la C en U. (*b*) Sitio AP. La despurinación (o, menos frecuentemente, la despirimidinación) consiste en el corte del enlace glucosídico entre el azúcar y la base. El resultado es un sitio abásico o sitio AP, pero no rompe la cadena azúcar-fosfato. (*c*) La O^6-metilguanosina es una lesión altamente mutagénica. (*d*) La luz ultravioleta provoca el entrecruzamiento de las pirimidinas adyacentes a lo largo de una cadena del DNA. Se muestra el esquema de un dímero *cis-syn* de timina en ciclobutano. (*e*) Se muestra un dímero de ciclobutano en un DNA de doble cadena; la cadena azúcar-fosfato se representa con un modelo de varillas para poner de manifiesto la distorsión de las bases entrecruzadas (amarillo) y las bases complementarias de la otra cadena.

Las bases son oxidadas a una velocidad apreciable por las especies de oxígeno reactivo, que son subproductos del metabolismo, produciendo muchos tipos de bases alteradas, por ejemplo, 8-hidroxiguanina (8-oxo G). El daño oxidativo tiende a aumentar con la edad. La *S*-adenosil metionina, transportador de grupos metilo en el metabolismo normal, ocasionalmente metila una base del DNA. Los productos de la peroxidación de los lípidos pueden unirse a las bases, especialmente a la G. Los agentes alquilantes añaden metilos u otros grupos alquilo a las bases.

La radiación ultravioleta (del sol o de las lámparas de bronceado) provoca la unión covalente de las pirimidinas adyacentes en una hebra del DNA para formar **dímeros *cys-sin* de pirimidina** en ciclobutano (Figura 4.26) y otros fotoproductos. Las radiaciones ionizantes, entre ellas los rayos X y la desintegración radiactiva, producen roturas de las cadenas y especies de oxígeno reactivas que dañan al DNA.

Los carcinógenos y los mutágenos atacan al DNA. Algunos actúan directamente, otros son **procarcinógenos**, que en forma nativa no dañan al DNA, pero pueden ser activados por procesos metabólicos (p. ej., oxidados por el citocromo P450) a carcinógenos y dañar al DNA. Este proceso se conoce como **activación metabólica**. El **benzo[*a*]pireno** del alquitrán del carbón es un procarcinógeno extremadamente potente que requiere la oxidación a la forma epoxi para atacar al DNA. Muchos agentes quimioterápicos atacan al DNA. Algunos provocan la alquilación de las bases, otros entrecruzan las dos cadenas.

Mutaciones

Las mutaciones son cambios heredables en la secuencia del DNA. Pueden ser el resultado de errores durante la replicación, de daños en el DNA o de errores durante la reparación de las lesiones. Las mutaciones debidas al cambio de un solo par de

bases se denominan **mutaciones puntuales**. Las **transiciones** son mutaciones puntuales en las cuales una purina es sustituida por una purina (A por G o G por A) o una pirimidina es sustituida por una pirimidina (T por C o C por T). La desaminación de la C, si no se repara produce una transición. Los análogos de las bases, como la 2-amino purina, aumentan la frecuencia de las transiciones. Las **transversiones** son mutaciones puntuales en las cuales una purina es sustituida por una pirimidina o viceversa (p. ej., A por C). Las **mutaciones de cambio de sentido** son mutaciones puntuales que cambian el aminoácido codificado (Figura 4.27). Las **mutaciones sin sentido** son mutaciones puntuales que generan un codón de terminación que detiene la traducción; habitualmente tienen efectos más severos que las mutaciones de cambio de sentido.

Las inserciones o las deleciones de uno o más pares de bases pueden producir **cambios del marco (o pauta) de lectura** (si el número de pares de bases no es múltiplo de tres) que desorganizan la codificación de la proteína. Los cambios de la pauta de lectura no sólo cambian los aminoácidos codificados más allá de la inserción o deleción, sino que también conducen generalmente a la terminación prematura (o más raramente la elongación) de la cadena polipeptídica. Algunos compuestos, como las **acridinas** y la **proflavina**, se intercalan en el DNA; es decir, se insertan entre pares de bases adyacentes lo que lleva normalmente a inserciones o deleciones de un solo par de bases. Algunas mutaciones también son el resultado de cambios a gran escala, como es la inserción de transposones.

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de mutación, la **expansión de tripletes**. Consiste en un gran incremento del número de tripletes repetitivos. Los tripletes repetidos constituyen un tipo de polimorfismo de repeticiones de secuencia simple (también llamadas microsatélites) que es frecuente en el genoma. En los individuos normales se observa un intervalo de variación del número de repeticiones, pues estas secuencias son altamente polimorfas. Cuando el número de repeticiones

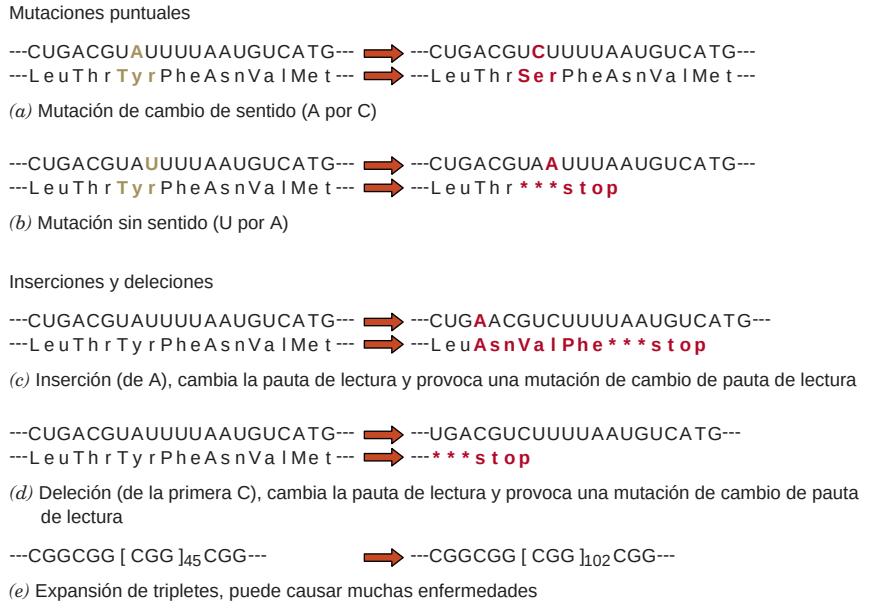


FIGURA 4.27
Mutaciones.
Se muestran varios tipos de mutaciones. (*a*) Una mutación de cambio de sentido cambia un único aminoácido del polipéptido codificado. (*b*) Las mutaciones sin sentido cambian un codón de un aminoácido en un codón de terminación que detiene la síntesis del polipéptido. (*c*) La inserción de un único nucleótido cambia la pauta de lectura de todos los codones más allá del punto de inserción; es común que dé lugar a la formación de un codón de terminación que termina la síntesis. (*d*) La deleción de un solo nucleótido cambia la pauta de lectura de todos los codones más allá del punto de inserción; normalmente da lugar a la formación de un codón de terminación que termina la síntesis. (*e*) La expansión de tripletes es un tipo de mutación descubierto recientemente que consiste en un gran aumento del número de repeticiones de un triplete. La expansión de tripletes causa muchas enfermedades, tales como la enfermedad de Hungtinton y la enfermedad del cromosoma X frágil, al añadir largas series de un solo aminoácido al polipéptido o al desorganizar la regulación del gen.

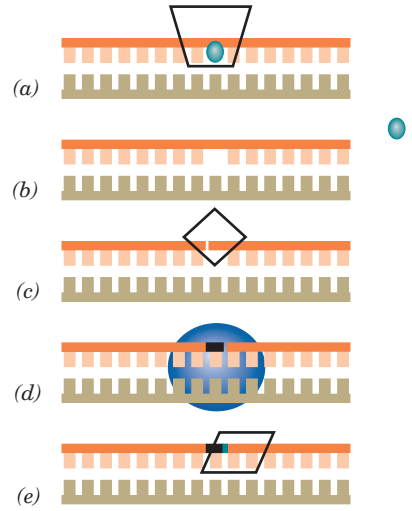


FIGURA 4.28
Reparación por escisión de base.
(*a*) El sitio dañado (punto azul) es reconocido por una DNA glucosilasa. (*b*) La base es eliminada mediante el corte del enlace glucosídico que la conecta a la desoxirribosa. La cadena azúcar-fosfato no se rompe. El resultado es un sitio AP. (*c*) La cadena azúcar-fosfato es cortada en el lado 5′ del sitio abásico por una AP endonucleasa. También hay un corte en el lado 3′ para eliminar el residuo de azúcar; esta reacción corre a cargo de algunas AP endonucleasas o por una actividad AP liasa. (*d*) El hueco de un único nucleótido es rellenado por una DNA polimerasa. (*e*) La mella que queda es sellada por una DNA ligasa.

se expande más de lo normal se genera una situación de premutación, que no tiene efectos fenotípicos, pero que frecuentemente conduce a una expansión masiva en la generación siguiente. Estas repeticiones mucho más largas de lo normal pueden causar enfermedades si insertan un largo segmento de un mismo aminoácido en un polipéptido, como en la **enfermedad de Huntington**. También pueden afectar la regulación de un gen, como en el **síndrome del cromosoma X frágil**.

Reparación por escisión

La **reparación por escisión** es un mecanismo general que puede reparar distintos tipos de lesiones. La ruta general es la misma, pero hay diferencias en algunos enzimas para tratar diferentes tipos de lesiones. La característica que define la reparación por escisión es la eliminación de los nucleótidos dañados, que deja un hueco en el DNA, seguida de síntesis basada en la información de la hebra opuesta, y, finalmente ligación para restablecer la continuidad del DNA. Hay dos tipos principales de reparación por escisión: reparación por escisión de base (BER) y reparación por escisión de nucleótido (NER) (Tabla 4.3).

Reparación por escisión de base

La **reparación por escisión de base** es un proceso esencial que repara muchos tipos de bases dañadas, incluidas las bases metiladas, desaminadas (p. ej. el U que resulta de la desaminación de la C) y oxidadas, así como los sitios abásicos (AP). El primer paso consiste en la eliminación de una única base dañada de la cadena del DNA por una **glucosilasa** que corta el enlace *N*-glucosídico entre el azúcar y la base. Este paso no rompe la cadena azúcar-fosfato del DNA (Figura 4.28). Deja una desoxirribosa abásica en la cadena, un sitio AP, que debe ser eliminado. Para eliminar el azúcar hacen falta dos actividades: una **AP endonucleasa** que corta el enlace fosfodiéster del lado 5′, dejando el azúcar todavía unido al siguiente nucleótido, y una **AP liasa** que corta del lado 3′ del sitio AP para eliminar el azúcar. El hueco de un solo nucleótido resultante tiene un 3′-hidroxilo libre. El hueco es rellenado y ligado por una DNA polimerasa y una DNA ligasa, respectivamente.

Hay muchos tipos distintos de glucosilasas, al menos ocho en humanos, cada una reconoce un cierto tipo de bases dañadas. Una de ellas, la **uracilo DNA glucosilasa (UNG)** está especializada en eliminar U del DNA. El U no es un componente normal del DNA, se forma cuando se desamina la C, y puede incorporarse ocasionalmente al DNA durante la replicación. La desaminación frecuente de C a U provocaría una elevada tasa de mutación; no es, pues, sorprendente que haya evolucionado un sella para su reparación. Sin embargo, muchos residuos de C de las secuencias CG de los mamíferos están metilados en posición 5; este hecho es importante para la expresión génica. La desaminación de los residuos de 5-metil C deja una T en lugar de una U en el DNA (Figura 4.26). Estos residuos de T no son reconocidos por la uracilo DNA glucosilasa. Hay glucosilasas que reconocen el par de bases desapareado T:G resultante y eliminan preferentemente la T. A veces, sin embargo, el sistema de reparación de desapareamientos elimina la G en lugar de la

TABLA 4.3 Reparación por escisión

Etapas principales	
• Reconocer la lesión	
• Eliminar la lesión escindiendo parte de una de las hebras	
• Nueva síntesis para llenar el hueco utilizando la información de la otra hebra	
• Ligar para restablecer la continuidad del DNA	
Reparación por escisión de base	**Reparación por escisión de nucleótido**
• La glucosilasa elimina la base, deja la cadena intacta	• Un corte doble elimina la lesión (12-13 nucleótidos en *E. coli*, 27-29 en humanos)
• La AP endonucleasa corta la cadena, la AP liasa elimina el azúcar	
• La DNA polimerasa rellena el hueco	• La DNA polimerasa llena el hueco
• La DNA ligasa sella la mella	• La DNA ligasa empalma la mella

T, produciendo una mutación. Ello ha dado lugar al cabo de millones de años a una frecuencia de dinucleótidos CG mucho más baja de la esperada estadísticamente en el DNA de los mamíferos.

La AP endonucleasa más importante en humanos es la APE1. Después de cortar la cadena por el lado 5′ del sitio AP para dejar un 3′-OH libre, la APE1 recluta la DNA polimerasa β (pol β). La pol β tiene una actividad AP liasa que elimina el azúcar-fosfato abásico en el lugar del corte de cadena sencilla, dejando un hueco de un solo nucleótido con un 3′-OH libre. Pol β también tiene actividad DNA polimerasa que puede rellenar el hueco. En muchos tipos de lesiones el hueco rellenado tiene uno o dos nucleótidos; se denomina **reparación a pequeña escala**. En los casos en que la AP liasa no es capaz de eliminar fácilmente el azúcar-fosfato, varios nucleótidos pueden ser desplazados y eliminados por la endonucleasa FEN1. El hueco relativamente mayor se rellena por una polimerasa tal como la pol β o, posiblemente la pol δ (o pol ε) estimulada por PCNA. En ambos casos, la DNA ligasa sella la mella que queda. El proceso está coordinado por interacciones proteína-proteína que protegen la mella y los intermediarios hasta la actuación del siguiente enzima.

Reparación por escisión de nucleótido

La reparación por escisión de nucleótido actúa sobre una amplia variedad de lesiones, normalmente de gran entidad, tales como la modificación con grandes grupos o distorsiones de la estructura en doble hélice. El caso mejor estudiado son los dímeros de pirimidina, que son el producto principal de las lesiones por luz ultravioleta. Las modificaciones químicas con carcinógenos como el benzo[*a*]pireno y la **aflatoxina** y con agentes quimioterápicos como el **cisplatino** son eliminados por esta vía, como lo son también las bases desapareadas y los pequeños lazos del DNA. La lesión es reparada por un complejo enzimático que corta a varios nucleótidos de distancia a ambos lados de la base o bases dañadas, de forma que la lesión se elimina como parte de un oligonucleótido (Figura 4.29).

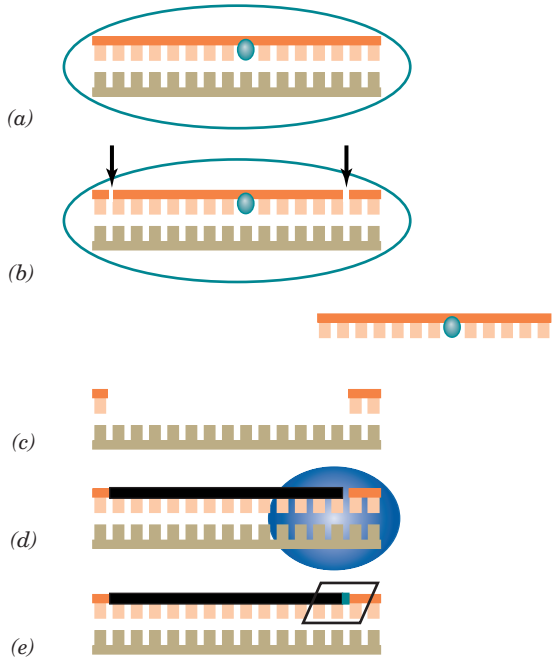


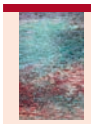
FIGURA 4.29
Reparación por escisión de nucleótido.
(*a*) La base dañada (punto azul) es reconocida por un complejo de reparación de DNA. (*b*) El segmento en torno a la lesión es escindido por un complejo enzimático que efectúa dos cortes en la misma cadena, uno a cada lado de la lesión. (*c*) Se libera un oligonucleótido (27-29 nucleótidos en humanos, 12-13 nucleótidos en *E. coli*). (*d*) Nueva síntesis de DNA: una polimerasa llena el hueco, usando la hebra opuesta como molde. (*e*) La DNA ligasa sella la mella que queda.

En *E. coli*, un complejo de escisión de la lesión, que contiene UvrA, UvrB y UvrC, reconoce el daño y practica dos cortes endonucleolíticos, uno 3-5 nucleótidos más abajo de la lesión y el otro 8 nucleótidos más arriba de la lesión. La lesión se elimina como parte de un oligonucleótido de 12-13 nucleótidos de longitud. El proceso comienza con el reconocimiento de la lesión por UvrA. La apertura de las hebras por UvrB (una helicasa) requiere energía. A continuación se une UvrC, que cataliza el corte a ambos lados de la lesión. Una DNA polimerasa llena el hueco y una ligasa sella la mella.

En humanos, varios complejos enzimáticos de gran tamaño se hallan implicados en el reconocimiento de la lesión, la apertura del DNA y los dos cortes. El **xeroderma pigmentoso (XP)**, una rara enfermedad de tipo autosómico recesivo, que hace a los pacientes fotosensibles y susceptibles a los cánceres de piel, es consecuencia de la mutación de cualquiera de los siete genes implicados en la reparación por escisión o de uno implicado en la reparación posreplicativa (véase la Apli. Clín. 4.7). XPC es parte de un complejo que se une fuertemente a las lesiones que distorsionan la estructura del DNA. XPA es un factor fundamental implicado en el reconocimiento de las lesiones y en el ensamblaje del complejo de escisión; las mutaciones del gen *XPA* imposibilitan la eliminación de los dímeros de pirimidina inducidos por UV. La reparación por escisión requiere la presencia de la proteína de unión a DNA de cadena sencilla RPA. XPA organiza un gran complejo denominado **TFII-H**, un factor de transcripción general implicado en la iniciación de la transcripción. TFII-H contiene subunidades de XPB y XPD, que son ambas ATPasas con actividad helicasa limitada. El DNA es parcialmente desenrollado por la actividad helicasa de TFII-H, que crea una burbuja de unos 25 pb. A continuación se une un heterodímero de XPF/ERCC1, que efectúa un corte endonucleolítico en la hebra dañada aproximadamente 22-25 nucleótidos más arriba de la lesión, mientras que XPG efectúa un corte endonucleolítico aproximadamente 5 nucleótidos más abajo de la lesión. Estos dos cortes liberan un oligonucleótido de 27-29 nucleótidos que contiene la lesión. La RPA se une al hueco resultante, que es rellenado por una polimerasa replicativa (pol δ o pol ε) estimulada por PCNA. La mella resultante es sellada por una DNA ligasa, probablemente LIG1. Estos útimos pasos recuerdan la finalización de un fragmento de Okazaki.

Acoplamiento de la reparación y la transcripción

Muchas lesiones bloquean la transcripción de la misma manera que bloquean la replicación. Por lo tanto las células afrontan un problema inmediato incluso si no están sintetizando DNA: deben ser capaces de sintetizar proteínas clave para sobrevivir. El mecanismo denominado **reparación acoplada a la transcripción** repara la hebra molde en las regiones transcritas con mayor rapidez que en las demás regiones. La importancia de este proceso para la supervivencia es obvia. La presencia de una RNA polimerasa bloqueada por una lesión puede impedir el normal reconocimiento de las lesiones. La reparación acoplada a la transcripción es una forma de reparación por escisión desencadenada por un complejo atascado de RNA polimerasa. En las células eucarióticas un complejo que contiene CSA y CSB (cuyas mutaciones causan el síndrome de Cockayne, otra enfermedad provocada por defi-



APLICACIÓN CLÍNICA 4.7
Xeroderma pigmentoso

El Xeroderma pigmentoso (XP) fue la primera enfermedad conocida causada por un mal funcionamiento de los mecanismos de reparación del DNA. Los pacientes son fotosensibles y muy propensos al cáncer de piel en la áreas expuestas del cuerpo. Muchos pacientes también tienen problemas neurológicos. El XP es una enfermedad infrecuente de carácter autosómico recesivo.

El XP puede estar causado por defectos en ocho genes diferentes. Defectos en siete de estos genes afectan a la etapa inicial de escisión de la reparación por escisión de nucleótido. Ello es un reflejo de la complejidad de los procesos de reparación. Las células defectivas en cualquiera de estos siete genes no pueden realizar el primer paso de incisión de los dímeros de pirimidina en ciclobutano. Estos dímeros son la lesión más común causada por la exposición a la luz ultravioleta, lo que explica la extrema fotosensibilidad característica de esta enfermedad. Otro tipo, denominado XP-V (por variante), no es deficiente aparentemente en la reparación por escisión, pero tiene un defecto en la reparación posreplicativa después del daño causado por la luz ultravioleta.

XPA es indispensable para el reconocimiento de los dímeros de pirimidina e interacciona con otras proteínas. XPB y XPD codifican proteínas que son subunidades del TFII-H, un factor de trascripción general que también es necesario para la reparación dependiente de transcripción. TFII-H puede funcionar como una helicasa, abriendo una región alrededor del dímero. El complejo ERCC1-XPF se une a TFII-H y corta en el lado 5′ del dímero. XPG corta en el lado 3′.

ciencias en la reparación) reconoce la RNA polimerasa detenida, la desplaza de la lesión y recluta proteínas de reparación. La vía de reparación por escisión de nucleótido se usa para muchos tipos de lesiones. Utiliza XPA, TFII-H y otros factores de reparación, pero XPC no es necesario para el reconocimiento de la lesión. Resultados recientes sugieren que la reparación acoplada a la transcripción también actúa sobre lesiones oxidativas reparadas por escisión de base. Una vez completada la reparación, la RNA polimerasa puede continuar la síntesis.

Reparación de apareamientos incorrectos

La **reparación de apareamientos incorrectos** es una forma especializada de reparación por escisión de nucleótido que elimina los errores de la replicación. Los apareamientos incorrectos difieren de las lesiones del DNA: no hay bases dañadas o modificadas, sólo una base incorrecta. El reconocimiento de los desapareamientos se basa en la distorsión de la estructura de la doble hélice. Una importante diferencia entre la reparación de las lesiones del DNA y la reparación de los apareamientos incorrectos radica en la elección de la base que tiene que ser eliminada. Hay enzimas que son capaces de reconocer las bases dañadas y eliminarlas de forma específica, tanto individualmente en la reparación por escisión de base o como parte de un oligonucleótido en la reparación por escisión de nucleótido. Pero cuando se reconoce un apareamiento incorrecto ambas bases son normales: ¿cuál hay que eliminar? La eliminación de la base recién sintetizada claramente preserva la información genética, mientras que la eliminación de la base de la hebra parental alteraría permanentemente al DNA, produciendo una mutación. La elección al azar provocaría mutaciones en la mitad de los casos, lo cual es inaceptablemente elevado. Por lo tanto, se trata de reconocer la hebra recién sintetizada y eliminar la base desapareada de esta hebra.

La hebra recién sintetizada puede ser reconocida durante el breve período de tiempo en que el DNA recién sintetizado todavía no ha sido metilado. El DNA de la mayoría de los organismos (pero no de todos) se metila en posiciones específicas. En bacterias como *E. coli*, la metilación se produce sobre todo en las A pertenecientes a la secuencia GATC. En los mamíferos la metilación ocurre principalmente en la C de la secuencia CG. Tanto GATC como CG son secuencias palindrómicas, es decir, la hebra opuesta tiene la misma secuencia cuando se lee en dirección 5′ a 3′, y ambas hebras están metiladas. Esta metilación no afecta al apareamiento de las bases, pero permite el reconocimiento de la posición metilada y afecta a la regulación génica. Estas bases se incorporan al DNA en su forma no modificada y más tarde son metiladas por una metilasa de mantenimiento. La **metilasa de mantenimiento** reconoce secuencias **semimetiladas** (metiladas en una sola hebra, la hebra parental) y metila la base apropiada. Pero hay un corto período de tiempo durante el cual el DNA sólo está semimetilado, y es entonces cuando el sistema de reparación de apareamientos erróneos de *E. coli* puede reconocer y eliminar específicamente la hebra recién sintetizada en la región del apareamiento incorrecto. Las células eucarióticas tienen un sistema similar de reparación de apareamientos erróneos, pero la manera como éste reconoce la hebra nueva no ha sido determinada; las secuencias CG semimetiladas o las mellas de cadena sencilla transitorias de los fragmentos de Okazaki no ligados pueden tener un papel.

El sistema de reparación de apareamientos erróneos mejor estudiado es el de *E. coli*. Los apareamientos erróneos son reconocidos por un homodímero de MutS, al que se une MutL (Figura 4.30). Los dos monómeros de MutS crean un bucle que contiene el apareamiento incorrecto. La hebra no metilada recién sintetizada es mellada cerca del sitio semimetilado. La hebra mellada es degradada por la helicasa II y por una 5′ a 3′ exonucleasa, como RecJ o exo VII, o por una 3′ a 5′ exonucleasa como exo I. La escisión, que se extiende más allá del apareamiento incorrecto, puede ocurrir en ambas direcciones y normalmente tiene una longitud de varios centenares de nucleótidos. El gran hueco que se forma es rellenado por la DNA polimerasa, que añade nucleótidos al extremo 3′ de la hebra mellada. Una vez que el hueco se ha rellenado, la DNA ligasa lo sella.

Los humanos poseen un sistema similar de reparación de apareamientos erróneos. Varios complejos reconocen los desapareamientos. El MutSα reconoce bases desapareadas y cortas inserciones/deleciones, estas últimas también son reconocidas por MutSβ; ambos contienen MSH2. Para el mellado se necesita un complejo MutLα. Los enzimas responsables de la escisión de la hebra mellada hasta un punto situado más allá del desapareamiento no han sido identificados. Como en *E. coli*, la

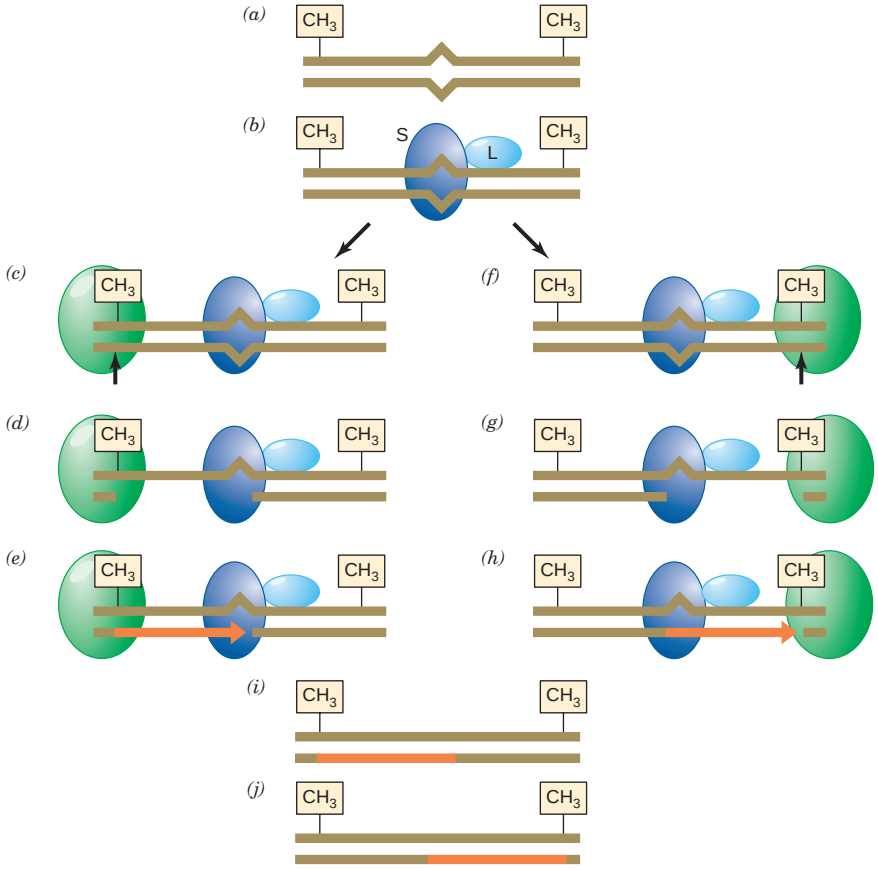


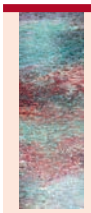
FIGURA 4.30
Reparación de apareamientos erróneos en *E. coli*.
(*a*) Un apareamiento erróneo en un DNA recién sintetizado. La hebra parental está metilada, pero la hebra nueva no lo está durante los primeros minutos después de su síntesis. (*b*) MutS y MutL se unen al desapareamiento. El ATP es hidrolizado a medida que estas proteínas forman un pequeño bucle de DNA. (*c, f*) Mut H se une a un sitio semimetilado (que puede encontrarse a uno u otro lado del desapareamiento; lados derecho e izquierdo). (*d, g*) El DNA de la hebra no metilada es cortado, escindido y después extendido más allá del desapareamiento. La extensión puede producirse en ambas direcciones (*d* y *g*). (*e, h*) El hueco resultante es rellenado por una DNA polimerasa, añadiendo nucleótidos en el extremo 3′ de la hebra. (*i, j*) La mella restante es sellada por una DNA ligasa. Finalmente, se produce la metilación de los sitios semimetilados (no mostrado).

región escindida tiene varios centenares de nucleótidos de longitud. La abrazadera deslizante, PCNA, es necesaria para la reparación de los apareamientos erróneos. Además de su papel de factor de procesividad para la DNA polimerasa, desempeña un papel en la etapa de escisión. El rellenado del gran hueco requiere DNA pol δ (o pol ε) y PCNA. La mella restante es empalmada por la DNA ligasa.

Se ha demostrado que el mal funcionamiento de la reparación de apareamientos erróneos causa **cáncer de colon hereditario no poliposo** (HNPCC) (véase la Apli. Clín. 4.8). La reparación de apareamientos erróneos desempeña otros papeles en las células. Puede producir conversión génica durante la recombinación, al eliminar y volver a sintetizar una de las hebras de un heterodúplex, usando la otra de molde. La reparación de apareamientos erróneos juega un papel paradójico en la resistencia de las células a los agentes citotóxicos, como los agentes metilantes (*N*-nitrosourea) y el cisplatino, usados en la quimioterapia del cáncer. Las células resistentes a menudo son deficientes en la reparación de apareamientos incorrectos. Ello sugiere que el reconocimiento de estas lesiones por las proteínas de reparación de apareamientos incorrectos (probablemente MutSα) puede desencadenar la muerte celular.

Desmetilación enzimática

Además de las bases normalmente metiladas, algunas bases son alquiladas erróneamente por carcinógenos o por interacción con los transportadores de metilos nor-



APLICACIÓN CLÍNICA 4.8
Reparación de apareamientos incorrectos y cáncer

Los defectos del sistema de reparación de apareamientos incorrectos causan cáncer de colon no poliposo hereditario (HNPCC) y probablemente son importantes en otros cánceres. La existencia de este nexo fue sugerida por el descubrimiento de frecuentes mutaciones en los microsatélites (cortas secuencias repetidas, particularmente de uno y de dos nucleótidos), un fenotipo conocido por inestabilidad de los microsatélites, en algunos tumores del colon.

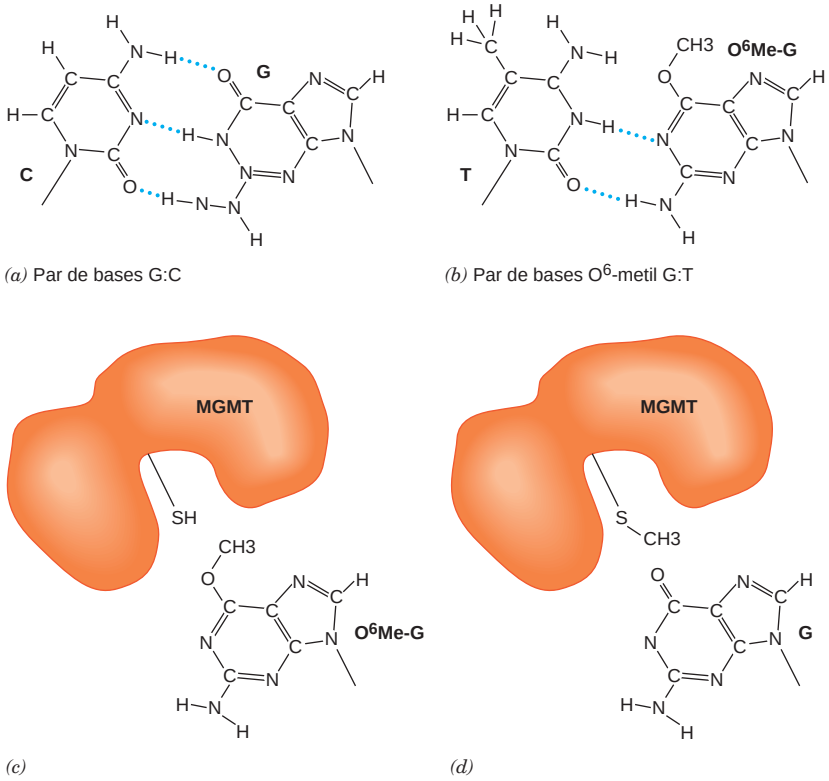
La HNPCC es una enfermedad autosómica dominante. Un gen que contribuye al riesgo de padecer HNPCC fue localizado en una región que contiene un gen de reparación de apareamientos incorrectos. Finalmente se demostró que el defecto primario consistía en una mutación de uno de los genes de reparación de apareamientos incorrectos. Los defectos de *MLH1*, *MSH2* o *PMS2* causan HNPCC.

¿Por qué la herencia de un solo alelo defectuoso de un gen de la reparación de apareamientos incorrectos provoca HNPCC? Las células que recubren el tracto intestinal se dividen activamente durante toda la vida. Hay una elevada probabilidad de que en algún momento de la vida tenga lugar una mutación somática en uno de los alelos de un gen de la reparación de apareamientos incorrectos en al menos una de las células del colon. Las células en las cuales uno de los alelos en cualquiera de estos loci sea inactivo pueden continuar reparando los apareamientos erróneos, por lo que generalmente no se desarrollará un tumor. Sin embargo, en un individuo que haya heredado un alelo inactivo, una mutación somática que inactive la única copia activa causará la inactivación de la reparación de apareamientos incorrectos. Las tasas de mutación en las células con la reparación de apareamientos incorrectos inactivada están incrementadas entre 100 y 1000 veces. La acumulación de mutaciones en los genes que regulan el crecimiento conduce finalmente a la formación de tumores.

males de la célula. La alquilación en las posiciones que afectan el apareamiento de las bases es muy mutagénica. Por ejemplo, La O^6-metil guanina se aparea con T en lugar de C (Figura 4.31). La replicación de esta base causaría una mutación. Las células poseen glucosilasas que reconocen las bases erróneamente metiladas y desencadenan la reparación por escisión de base; pero las células también poseen proteínas especiales que reconocen la O^6-metil guanina en el DNA y directamente eliminan el grupo metilo sin alterar al DNA. La **O^6-metil guanina metil transferasa** (MGMT) reconoce esta lesión específica del DNA y transfiere el grupo metilo de la guanina a una cisteína de la propia proteína (Figura 4.31). Una molécula de MGMT puede transferir un solo grupo metilo; la metilación de la cisteína inutiliza la proteína para otras trasferencias y la proteína inactivada es degradada por la vía proteolítica de la ubiquitina. El coste para la célula es alto. Debe replicar un fragmento de DNA para mantener el gen de este enzima, transcribir el gen, modificar el transcrito y sintetizar la proteína. Todos estos pasos requieren un gasto considerable de materia y energía. Y todo ello para eliminar un único grupo metilo del DNA. Ello pone una vez más de manifiesto cuan importante es mantener la integridad del genoma, incluso a costa de un elevado coste metabólico.

Fotorreactivación

La **fotorreactivación** es un mecanismo especifico para reparar los dímeros de pirimidina en ciclobutano, las principales lesiones producidas por la radiación ultravioleta. La fotorreactivación consiste en una reversión directa de la lesión. Un enzima especializado, denominado **fotoliasa**, se une a la lesión (Figura 4.32). Al absorber luz, cataliza la reversión de los enlaces entre las pirimidinas adyacentes, dejando al DNA exactamente como estaba antes de la formación de los dímeros. Se



(a) Par de bases G:C *(b)* Par de bases O^6-metil G:T

(c) *(d)*

FIGURA 4.31
Desmetilación enzimática.
(*a*) Par de bases G:C normal. (*b*) Par de bases O^6-metil G:T. Este apareamiento favorecería la incorporación de una T enfrente de una G durante la replicación y causaría una mutación en la generación siguiente. (*c*) La MGMT (metil guanina metil transferasa) puede unirse a la O^6-metil G. (*d*) La MGMT transfiere un grupo metilo del O^6 de la guanina al grupo sulfhidrilo de la proteína, dejando una G intacta en el DNA. La proteína metilada es inactiva.

trata de una reversión directa de la lesión. La fotorreactivación, de gran importancia en la mayoría de los organismos, tiene un papel insignificante en los mamíferos.

Las lesiones pueden bloquear la replicación

La fidelidad y la capacidad correctoras de las DNA polimerasas generalmente evitan la inserción de nucleótidos enfrente de bases dañadas. Por lo tanto, cuando un complejo de replicación alcanza una lesión en la hebra molde, se detiene. Esta situación, que provoca un retraso en la replicación, debe resolverse para completar la replicación. Para ello hay tres procedimientos generales: el complejo puede disociarse o retroceder para permitir la reparación de la lesión, saltarse la lesión para reanudar la síntesis más allá (dejando un hueco en la hebra hija) o continuar la síntesis a través de la lesión. Los tres tienen lugar y todos presentan problemas.

Reparación de huecos en la hebra hija

Muchos tipos de lesiones bloquean la replicación. Si se reanuda la replicación más allá de la lesión, queda un hueco en el DNA. Esta situación es más fácil de representar en la hebra retrógrada, donde puede ocurrir simplemente por disociación de la polimerasa del sitio de la lesión seguida de reasociación para sintetizar el siguiente fragmento de Okazaki a través del mecanismo de replicación normal (Figura 4.33). Los huecos en el DNA son potencialmente letales. Además, una lesión enfrente de un hueco no es un sustrato para la reparación por escisión, que requiere una hebra intacta enfrente de la lesión que suministre la información necesaria para la reparación. La **reparación de huecos en la hebra hija** (recombinación posreplicativa) no elimina la lesión, pero repara el hueco causado por la lesión. La célula queda así protegida de los potenciales derivados de los huecos y también se genera un sustrato que permite que la reparación por escisión actúe directamente sobre la lesión.

La reparación de huecos en la hebra hija se basa en la recombinación (Figura 4.33). El DNA de cadena sencilla, tal como el que se encuentra enfrente de un hueco, es recombinogénico; es decir, estimula la recombinación. La recombinación entre dos dúplex permite transferir un fragmento de la hebra parental al hueco (la hebra parental de un lado de la horquilla tiene la misma polaridad que la hebra hija del otro lado). Esta operación deja un hueco en la hebra parental que donó el fragmento, pero, puesto que tiene una hebra normal enfrente, el hueco puede ser rellenado fácilmente por la DNA polimerasa y empalmado por la DNA ligasa. El hueco es, pues, reparado, aunque la lesión permanece. Como se ha indicado anteriormente, en esta configuración la lesión es sustrato de la reparación por escisión.

Un complejo de replicación que se haya detenido en una lesión de la hebra retrógrada puede reanudar fácilmente la síntesis en el siguiente fragmento de Oka-

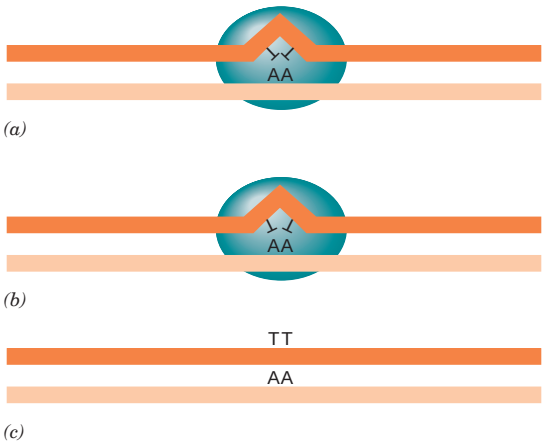


FIGURA 4.32
Fotorreactivación.
(*a*) La fotoliasa se une a un dímero de pirimidina en ciclobutano; la luz no es necesaria para este paso. (*b*) El complejo absorbe luz, lo que provoca la rotura de los enlaces que unen las pirimidinas adyacentes. (*c*) A continuación el enzima se disocia del DNA.

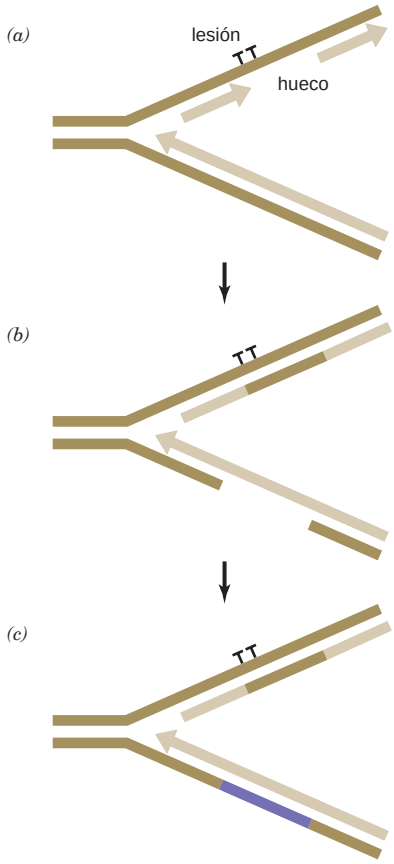


FIGURA 4.33
Reparación de huecos de la hebra hija (reparación por recombinación).
(*a*) La detencón de las horquillas de replicación en las lesiones produce huecos. Al no haber DNA intacto enfrente, no son sustrato para la reparación por escisión. (*b*) La recombinación hace posible que la hebra parental isopolar llene el hueco de la hebra hija, lo cual deja un hueco en la hebra parental. (*c*) El hueco en la hebra parental puede ser rellenado por una DNA polimerasa, porque hay un molde intacto enfrente. El hueco de la hebra hija es reparado, pero la lesión permanece. Observe que la lesión ahora puede repararse por reparación por escisión, porque ahora enfrente hay una hebra intacta.

zaki, usando los mecanismos normales de síntesis de la hebra discontinua. La reiniciación de la hebra continua más allá de un bloqueo es más difícil, porque la iniciación está rígidamente controlada en los orígenes de replicación. Las horquillas de replicación bloqueadas pueden arrancar de nuevo mediante recombinación, con migración extensiva de la rama, seguida de separación, que puede volver a crear la estructura de una horquilla de replicación más allá del sitio de la lesión. Con ello todavía queda pendiente el ensamblaje del complejo de replicación de forma independiente del origen, los detalles del cual todavía no están claros.

Cuando una horquilla de replicación encuentra una mella en una sola hebra, la convierte en un corte de doble cadena. Los cortes de doble cadena son potencialmente letales. La principal vía de supervivencia celular incorpora la reparación de cortes de doble cadena, por mecanismos similares a los de la recombinación mediante cortes de doble cadena. Se ha calculado que en las células de mamíferos se forman unos diez cortes de este tipo durante un solo ciclo celular, de ahí la importancia de la reparación de los cortes de doble cadena para la supervivencia celular.

Síntesis a través de la lesión

Una alternativa a la formación de huecos cuando hay lesiones en la hebra molde es continuar la síntesis a través de la lesión, proceso denominado **síntesis a través de la lesión** (Figura 4.34). Una polimerasa correctora de pruebas muy precisa no puede desempeñar con facilidad esta tarea. Esta función la realiza una familia de polimerasas de fidelidad reducida (véase Tabla 4.2). La fidelidad disminuida au-

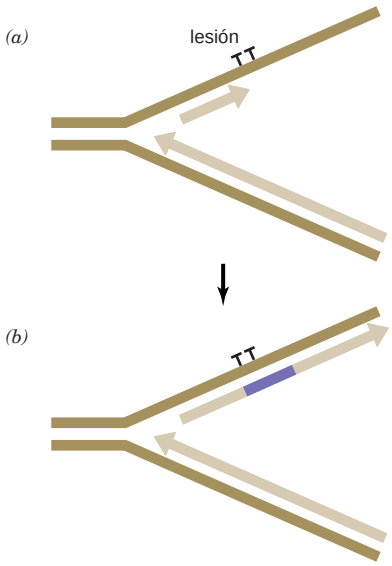


FIGURA 4.34
Síntesis a través de la lesión.
(*a*) Las lesiones del molde generalmente detienen a las DNA polimerasas replicativas, pues éstas no son capaces de añadir un nucleótido enfrente de una lesión no codificadora o de una distorsión. (*b*) DNA polimerasas especializadas pueden insertar nucleótidos enfrente de lesiones del molde y, pasándolas por alto, lograr la síntesis de hebras hija sin huecos. Para ello es necesario relajar la corrección de pruebas, lo cual implica la introducción de errores (mutaciones potenciales) con una alta probabilidad.

menta mucho la probabilidad de que se incorpore un nucleótido equivocado. Las consecuencias negativas que ello pueda acarrear son evidentemente menores que las derivadas de un bloqueo largo (o permanente) de la replicación.

En *E. coli* las DNA polimerasas IV (DinB) y V (complejo $UmuD'_2C$) son inducidas como parte de la respuesta SOS, descrita más adelante. Ello garantiza que los mecanismos imprecisos de replicación sólo funcionen cuando las lesiones del DNA sean suficientemente graves como para desencadenar la respuesta SOS, limitando así el riesgo de mutaciones a las situaciones en las cuales la viabilidad celular está seriamente comprometida. Ambas son mucho menos precisas que las polimerasas replicativas normales III y I. Poseen una baja procesividad, generalmente incorporan menos de 10 nucleótidos antes de disociarse del DNA. Ello limita el número de mutaciones introducidas.

Los eucariotas también poseen polimerasas propensas al error (véase Tabla 4.2). La DNA polimerasa η incorpora preferentemente A enfrente de los dímeros de timina creados por irradición ultravioleta, lo cual reduce la probabilidad de mutaciones en estas lesiones. Sin embargo, la polimerasa η carece de actividad de corrección de pruebas, e incorpora un nucleótido desapareado cada 20-400 nucleótidos, lo que hace necesario que su actividad esté estrechamente regulada. Una segunda polimerasa propensa al error es la DNA polimerasa ι, también muy imprecisa; incorpora nucleótidos enfrente de lesiones muy distorsionantes o de lesiones como los sitios abásicos que normalmente no pueden servir de molde. Estas polimerasas actúan concertadamente con otro enzima, la polimerasa ζ, que no añade nucleótidos enfrente de las lesiones, pero extiende las estructuras formadas por otras polimerasas propensas al error hasta que la polimerasa replicativa normal toma el relevo. Estas polimerasas son distributivas, por lo que la región donde es probable que se introduzcan mutaciones es pequeña, lo que limita la incidencia de las mutaciones.

Reparación de roturas de cadena doble

Las **roturas de cadena doble** (DSB) son potencialmente letales. Estimulan la recombinación genética, que puede provocar translocaciones cromosómicas, que, si no son reparadas, causan la rotura de los cromosomas y la muerte celular. Numerosos agentes pueden causar roturas de doble cadena, en particular, las radiaciones ionizantes, las especies de oxígeno reactivas y muchos agentes quimioterápicos que generan radicales libres oxidantes (bleomicina) o inhiben a las topoisomerasas. Las DSB pueden repararse por recombinación homóloga (descrita anteriormente; véase la Figura 4.25) o por unión de extremos no homólogos. En las levaduras predomina la recombinación homóloga; en los mamíferos predomina la unión de extremos no homólogos.

Regulación de la reparación: El regulón SOS

En *E. coli*, las lesiones en el DNA desencadenan la **respuesta SOS**, un cambio coordinado de la expresión génica que ayuda a recuperarse del daño. La respuesta SOS consiste en la inducción coordinada de un gran número de genes cuya transcripción se encuentra regulada al menos en parte por un represor común, LexA. Entre estos genes se encuentran *uvrA*, *uvrB*, *uvrV*, *recA* y el propio *lexA*. (Hay un bajo nivel constitutivo de muchos de los genes SOS porque la represión por LexA no es completa.) Un **regulón** es un grupo de operones regulados por un represor común. La respuesta SOS es desencadenada por grandes fragmentos de DNA de cadena sencilla como los de los huecos producidos en el bloqueo de la replicación (Figura 4.35). La proteína RecA se encuentra normalmente en bajas concentraciones en las células y puede polimerizar cooperativamente a lo largo del DNA de cadena sencilla polimerizándose y formando un filamento de nucleoproteína. En este estado, RecA está "activada" y se une a una proteína llamada LexA, cuya tasa de degradación en fragmentos inactivos resulta incrementada. Por lo tanto, los genes normalmente reprimidos por LexA son activados. Como se ha indicado anteriormente, RecA participa en la reparación de los huecos de las hebras hija. Los otros genes inducibles por lesiones (genes *din*) producen proteínas que ayudan a la recuperación celular e inhiben la iniciación de nuevas horquillas de replicación y la división celular hasta que la reparación se ha completado (Figura 4.35).

La autorregulación de *lexA* se basa en un solo bucle de retroalimentación y permite de manera efectiva una rápida, aunque transitoria, respuesta a las lesiones del DNA. Cuando se corta la proteína LexA, entre los muchos genes del regulón SOS

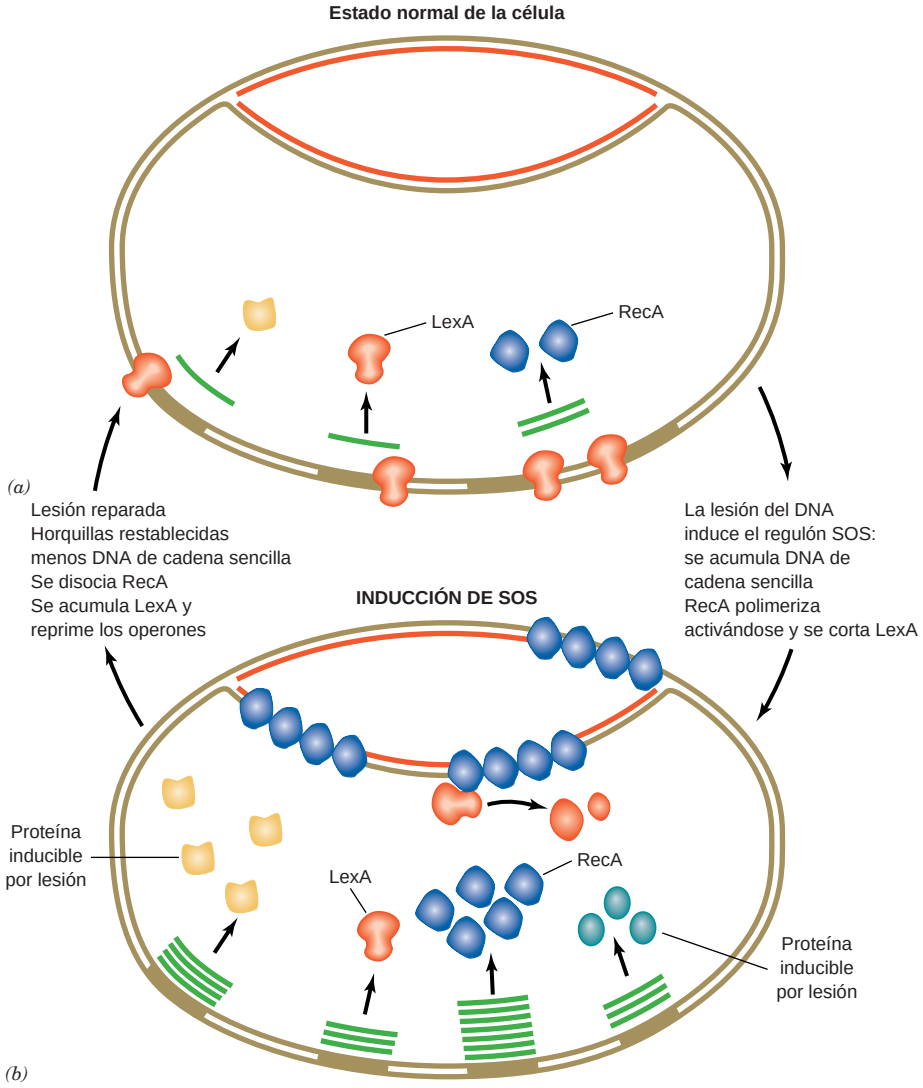


FIGURA 4.35
Regulación de la reparación y recuperación del DNA en *E. coli*: la respuesta SOS. (*a*) En las células no dañadas, un grupo de operones que constituyen el regulón SOS están regulados por un represor común, denominado LexA. Este regulón comprende el propio gen *lexA* (autorregulación) y el gen *recA*, junto con muchos otros genes que codifican enzimas que participan en la reparación de las lesiones. La mayoría de estos genes se encuentran reprimidos por la unión de LexA a sitios operadores de su región reguladora, a pesar de que hay transcripción residual de algunos de ellos, incluido *lexA* y *recA*. (*b*) Las lesiones bloquean las horquillas de replicación y por lo tanto dejan DNA de cadena sencilla. RecA es "activada" por unión al DNA de cadena sencilla. En esta forma, favorece el corte de LexA. Los fragmentos cortados de LexA no pueden unirse a los operadores, por lo que se induce el conjunto completo de operones. Como consecuencia, se sintetiza mucho más RecA, junto con otras proteína, incluida LexA. Mientras que el daño permanezca y RecA siga activada, LexA continúa siendo cortada y por lo tanto los operones permanecen activos. Cuando se repara el daño, RecA se "desactiva" y deja de cortar a LexA, por lo tanto la concentración de LexA activa aumenta y desactiva el regulón.

inducidos se encuentra el propio *LexA*, por lo que la cantidad de lexA aumenta significativamente. Sin embargo, mientras las lesiones del DNA continúen estando presentes y la proteína RecA esté todavía activada, la proteína LexA continuará siendo cortada y no podrá reprimir muchos genes. A medida que se reparan las lesiones, la cantidad de RecA activada disminuye y, por lo tanto, el corte de LexA (cuya síntesis también había aumentado a causa de la autorregulación por unión de LexA a su propio promotor) disminuye. Los niveles incrementados de LexA en la célula se unen a los operadores de los genes *din* y la respuesta SOS es gradualmente anulada.

BIBLIOGRAFÍA

Baynton, K. y Fuchs, R. P. P. Lesions in DNA: hurdles for polymerases. *Trends Biochem. Sci.* 25:75, 2000.

Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C. y Wang, J. C. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379:225, 1996.

Blow, J. J. y Tada, S. A new check on issuing the license. *Nature* 404:560, 2000.

Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J. y Marians, K. J. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404:37, 2000.

Evans, A. R., Limp-Foster, M. y Kelley, M. R. Going ape over Ref-1. *Mutat. Res.* 461:83, 2000.

Flores-Rozas, H. y Kolodner, R. D. Links between replication, recombination, and genome instability in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 25:196, 2000.

Friedberg, E. C., Walker, G. C. y Siede, W. *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, D.C.: American Society of Microbiology, 1995.

Haber, J. E. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* 25: 271, 2000.

Hanawalt, P. C. Transcription-coupled repair and human disease. *Science* 266:1957, 1994.

Hanawalt, P. C. The bases for Cockayne syndrome. *Nature* 405:415, 2000.

Hubscher, U., Nasheuer, H.-P. y Syvaoja, J. E. Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. *Trends Biochem. Sci.* 25:143, 2000.

Human genome project. http://www.nhgri.nih.gov/HGP/.

Human genome sequencing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/.

Johnson, R. E., Washington, M. T., Haracska, L., Prakash, S. y Prakash, L. Eukaryotic polymerases ι and ζ act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* 406:1015, 2000.

Kowalczykowski, S. C. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.* 25:156, 2000.

Lindahl, T. y Wood, R. D. Quality control by DNA repair. *Science* 286:1897, 1999.

Modrich, P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 266:1959, 1994.

Naktinis, V., Turner, J. y O'Donnell, M. A molecular switch in a replication machine defined by an internal competition for protein rings. *Cell* 84:137, 1996.

Sancar, A. Excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270:15915, 1995.

Stillman, B. Cell cycle control of DNA replication. *Science* 274:1659, 1996.

Stahl F. Meiotic recombination in yeast: coronation of the double-strand-break repair model. *Cell* 87:965, 1996.

Von Hippel, P. H. y Jing, D. H. Bit players in the trombone orchestra. *Science* 287:2435, 2000.

Waga, S. y Stillman, B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 replication in vitro. *Nature* 369:207, 1994.

Watson, J. D. y Crick, F. H. C. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964, 1953.

Yu, Z., Chen, J., Ford, B. N., Brackley, M. E. y Glickman, B. W. Human DNA repair systems: an overview. *Environ. Mol. Mutagen.* 33:3, 1999.

Zakian, V. A. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270:1601, 1995.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones sobre las DNA polimerasas de *E. coli* es correcta?
   A. todas las polimerasas tienen a la vez actividad exonucleolítica de 3′ a 5′ y de 5′ a 3′.
   B. la función principal de la DNA polimerasa III es la reparación del DNA.
   C. las polimerasas I y III requieren a la vez un cebador y un molde.
   D. la polimerasa I tiende a permanecer unida al molde hasta que se ha añadido un número muy grande de nucleótidos.
   E. la especificidad de la reacción de la polimerasa es inherente a la naturaleza de las polimerasas.

2. Ambas hebras del DNA sirven conjuntamente de molde en:
   A. la replicación.
   B. la reparación por escisión.
   C. la reparación de apareamientos erróneos.
   D. la reparación acoplada a transcripción.
   E. todas las anteriores son ciertas.

3. La replicación:
   A. es semiconservadora.
   B. sólo requiere proteínas con actividad DNA polimerasa.
   C. utiliza una actividad polimerasa de 5′ a 3′ para sintetizar una hebra y una actividad polimerasa de 3′ a 5′ para sintetizar la hebra complementaria.
   D. requiere un cebador en los eucariotas pero no en los procariotas.
   E. debe empezar con un paso de escisión.

4. La naturaleza discontinua de la síntesis del DNA:
   A. requiere que la DNA polimerasa III (o un enzima eucariótico apropiado) se disocie del molde cuando alcanza el extremo de cada región de cadena sencilla.
   B. es necesaria solamente porque la síntesis es bidireccional desde el punto de iniciación.
   C. da lugar a la síntesis de los fragmentos de Okazaki.
   D. significa que la síntesis de la segunda hebra tiene lugar sólo después de completar la síntesis de la primera.
   E. significa que se usan polimerasas de 3′ a 5′ y de 5′ a 3′.

5. Los siguientes factores participan en el desenrollamiento y separación de las hebras del DNA para su replicación EXCEPTO:
   A. la tendencia de las superhélices negativas a desenrollarse parcialmente.
   B. la desestabilización de los pares de bases complementarios por las helicasas.
   C. la acción de las topoisomerasas.
   D. la actividad enzimática de las proteínas SSB.
   E. la energía en forma de ATP.

6. En la replicación del DNA en los eucariotas:
   A. sólo se forma un replisoma porque hay un solo origen de replicación.

B. los fragmentos de Okazaki tienen 1000-2000 nucleótidos de longitud.
C. la helicasa se disocia del DNA tan pronto se forma la burbuja de iniciación.
D. al menos una DNA polimerasa tiene actividad exonucleolítica de 3′ a 5′.
E. el proceso tiene lugar a lo largo de todo el ciclo celular.

7. Todas las afirmaciones siguientes sobre la telomerasa son verdaderas EXCEPTO:
A. el componente de RNA actúa de molde para la síntesis de un segmento de DNA.
B. añade telómeros a los extremos 5′ de las hebras de DNA.
C. suministra un mecanismo para la replicación de los extremos de los cromosomas lineales en la mayoría de los eucariotas.
D. reconoce la cadena rica en G del DNA.
E. es una transcriptasa inversa.

8. Una transición es una mutación que:
A. ocurre cuando una purina es sustituida por una pirimidina o viceversa.
B. resulta de una inserción de una o dos bases o análogos de las bases en la cadena del DNA.
C. su frecuencia disminuye en presencia de análogos de las bases tales como la 2-amino purina.
D. resulta de la sustitución de una purina por otra o de una pirimidina por otra.
E. es siempre una mutación de sentido equivocado.

9. La recombinación homóloga:
A. sólo ocurre entre dos segmentos del mismo DNA.
B. requiere la presencia de una secuencia específica de DNA.
C. requiere que uno de los dúplex implicados en la recombinación esté cortado en las dos cadenas.
D. puede dar como resultado el intercambio de hebras por migración de la rama.
E. está catalizada por transposasas.

10. Todos los enunciados siguientes sobre la transposición son verdaderos EXCEPTO:
A. los transposones se mueven de un lugar a otro en el cromosoma.
B. los lugares dadores y aceptores deben ser homólogos.
C. los transposones tienen secuencias de inserción que son reconocidas por transposasas.
D. los transposones pueden escindirse y desplazarse o replicarse.
E. la transposición puede tanto activar como desactivar a un gen.

Preguntas 11 y 12: Los retrovirus, como el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), que causa el SIDA (síndrome de la inmunodeficiencia adquirida), tienen la información genética en forma de RNA. Sin embargo, la transcriptasa inversa sintetiza una copia de DNA del genoma vírico. Uno de los fármacos más usados en el tratamiento del SIDA es el AZT, un análogo de la desoxitimidina, que tiene un grupo azido en la posición 3′ del azúcar. Puede ser fosforilado y compite con el dTTP por la incorporación en el transcrito inverso. Una vez incorporado, termina la elongación de la cadena.

11. La elongación de la cadena termina porque:
A. el análogo no puede formar puentes de hidrógeno con el RNA.
B. la presencia de AZT inhibe la actividad correctora de pruebas de la transcriptasa inversa.
C. La elongación requiere un 3′-OH para atacar al nucleótido entrante y el análogo AZT no tiene un 3′-OH libre.
D. el análogo causa una distorsión de la cadena en crecimiento que inhibe a la transcriptasa inversa.
E. el dTTP ya no puede añadirse a la cadena en crecimiento.

12. Hay una ventana terapéutica en la que el efecto es principalmente sobre la replicación vírica porque el AZT es mucho menos efectivo compitiendo con el dTTP para su incorporación por las DNA polimerasas celulares. Ello puede estar relacionado con la actividad correctora de pruebas de las DNA polimerasas. La actividad correctora de pruebas para mantener la fidelidad de la síntesis de DNA:
A. tiene lugar después de finalizar la síntesis.
B. depende de la actividad exonucleasa de 3′ a 5′ intrínseca o asociada a las DNA polimerasas.
C. requiere la presencia de un enzima distinto de la DNA polimerasa.
D. ocurre en los procariotas pero no en los eucariotas.
E. es independiente de la actividad polimerasa en los procariotas.

Preguntas 13 y 14: Los pacientes de la poco frecuente enfermedad genética xeroderma pigmentoso (XP) son muy sensibles a la luz y susceptibles a padecer cánceres de piel en las áreas del cuerpo expuestas a la luz solar. Muchos pacientes presentan también problemas neurológicos. Aunque es una dolencia rara, el estudio de estos pacientes ha mejorado nuestros conocimientos sobre la reparación del DNA porque el XP está causado por una deficiente reparación del DNA, concretamente de la reparación por escisión de nucleótido. (Hay una variante, XP-V que es deficiente en la reparación posreplicativa.)

13. Los siguientes enunciados acerca de la reparación por escisión de nucleótido son verdaderos EXCEPTO:
A. la eliminación de las bases dañadas tiene lugar solamente en una de las hebras del DNA.
B. elimina los dímeros de timina generados por la luz UV.
C. precisa de la actividad de una nucleasa de escisión, que es una endonucleasa.
D. requiere polimerasa I (*E. coli*) y ligasa.
E. sólo se eliminan los nucleótidos dañados.

14. El defecto en el XP está en la reparación por escisión de nucleótido. Otro tipo de reparación del DNA es la reparación por escisión de base. La reparación por escisión de base:
A. se usa sólo para las bases que han sido desaminadas.
B. usa enzimas llamadas DNA glucosilasas que generan un sitio con un azúcar abásico.
C. elimina unos 10-15 nucleótidos.
D. no requiere una endonucleasa.
E. reconoce una lesión voluminosa.

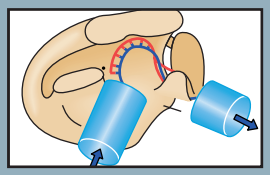
Problemas

15. La replicación de apareamientos incorrectos elimina los errores de la replicación mediante la escisión de las bases incorrectas. No hay lesiones en el DNA o bases modificadas, solamente una base normal, pero incorrecta. ¿Cómo distingue la célula la hebra recién sintetizada, que tiene que eliminarse, de la hebra correcta parental, que tiene que mantenerse?

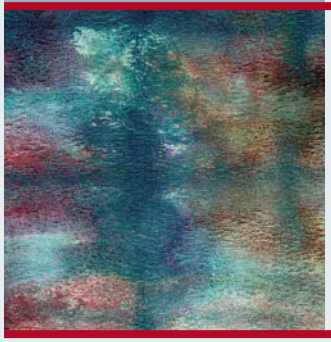
16. En la hebra codificadora del DNA del gen alfa de la hemoglobina normal (HbA), las tres bases que corresponden a la posición 142 del mRNA son TAA y la cadena alfa tiene 141 aminoácidos. En la hebra codificadora del gen de la cadena alfa las tres bases en la misma posición son CAA y la cadena alfa de la hemoglobina "Constant Spring" que se forma tiene 172 aminoácidos. Explicar qué tipo de mutación se ha producido. ¿Es una mutación de desplazamiento de pauta de lectura o una mutación puntual?

RESPUESTAS

1. **C** El cebador es el extremo 3′ inicial de una hebra existente y el molde es la parte libre de la hebra complementaria. A: La Pol III tiene la actividad de 3′ a 5′, pero no la otra. B: La polimerasa III funciona en la síntesis. D: La polimerasa I tiene una baja procesividad porque se disocia después de haber añadido unos pocos nucleótidos. E: La especificidad es función de los puentes de hidrógeno complementarios entre la base añadida y el molde.
2. **A** Permite la síntesis de dos moléculas de DNA idénticas. B, C: En ambas el segmento dañado es eliminado, por lo tanto ninguna hebra está disponible. D: Se trata de reparación por escisión.
3. **A** El nuevo DNA tiene una hebra parental y una hebra nueva. B, D: La replicación requiere un cebador, normalmente sintetizado por una primasa. También se necesitan ligasas, helicasas y otras proteínas. C: En la replicación participan los fragmentos de Okazaki porque la síntesis ocurre solamente en dirección 5′ → 3′. E: La escisión es la etapa de identificación de la reparación del DNA.
4. **C** Son los segmentos de DNA sintetizados sobre el cebador. A: La DNA polimerasa permanece unida al molde y se desliza sobre el siguiente cebador para continuar la síntesis. B, E: Este mecanismo compensa la imposibilidad de sintetizar de 3′ a 5′ y sería necesario incluso si la síntesis fuese unidireccional. D: Ambas hebras son sintetizadas simultáneamente.
5. **D** Las proteínas SSB tienen un papel muy importante en la estabilización de las hebras sencillas después de la separación, pero no son enzimas. A: Es especialmente cierto en las regiones ricas en AT. B, E: Ayuda al desenrollamiento inicial consumiendo ATP. C: Las topoisomerasas cortan y empalman una de las hebras para impedir la introducción de un número creciente de vueltas superhelicoidales negativas.
6. **D** La polimerasa α muestra esta actividad que permite la corrección de pruebas durante la síntesis. La δ y la ε la poseen para la corrección de pruebas. A: Hay múltiples sitios de iniciación. B: Este es el tamaño de los fragmentos de Okazaki de los procariotas; en los eucariotas los fragmentos tienen unos 200 nucleótidos. C: La actividad helicasa también es necesaria para la continuación de la síntesis, es decir, para la apertura de las horquillas. E: La replicación está restringida a la fase S.
7. **B** Los telómeros se encuentran en el extremo 3′ de cada cadena de forma que los extremos 5′ puedan replicarse. A, C: La telomerasa se sitúa en el extremo 3′ del DNA y suministra el molde para extender este extremo. D: Esta es una característica del extremo 3′. E: Utiliza un molde de RNA para sintetizar DNA.
8. **D** Esta es la definición —por ejemplo, A por G o T por C. B: Es un desplazamiento de la pauta de lectura y las transiciones son mutaciones puntuales. C: La frecuencia de mutación aumenta. E: Podría ser una mutación de cambio de sentido si el cambio codificara un aminoácido diferente o una mutación sin sentido si el cambio introdujese en el código una señal de terminación.
9. **D** Este es sólo un aspecto de este complejo proceso. A, B: Puede ocurrir entre dos moléculas de DNA diferentes; es necesario que las secuencias sean homólogas, pero no específicas. C: Se trata habitualmente de cortes en una sola de las cadenas como prevén los modelos de Holliday y de Meselson-Radding. E: Estos son los enzimas de la recombinación específica de sitio.
10. **B** Solamente el dador requiere una secuencia de nucleótidos específica; no se requiere homología. A: Esta es la definición. C: Esta es una de las características básicas. D: Ambas operaciones están catalizadas por transposasas. E: La inserción en la mitad de una gen lo inactivaría; la inserción de un promotor junto a un gen puede activarlo.
11. **C** La química de formación de las cadenas de nucleótidos requiere un 3′-OH libre en el extremo de la cadena para la unión al siguiente nucleótido. A: La presencia del grupo azido no afecta a la formación de puentes de hidrógeno. B: La transcriptasa inversa no posee propiedades de corrección de pruebas. D: Esto no se produce. E: El análogo AZT compite con el dTPP; no lo elimina.
12. **B** Esta actividad elimina la base recién añadida si no está correctamente apareada con el molde. A: Se trata de la reparación. C: La mayoría de las polimerasas son enzimas multifuncionales que tienen actividad correctora de pruebas. A veces se usa otra proteína asociada con el complejo. D: No todas la polimerasas eucarióticas tienen actividad exonucleasa 3′ → 5′, pero algunas sí la tienen. E: Parece que el sitio activo de la polimerasa es el encargado de reconocer el desapareamiento y de dirigir el extremo 3′ al sitio de corrección de pruebas.
13. **E** Los cortes se realizan varios nucleótidos a ambos lados de las bases dañadas. A: La hebra sin cortar sirve de molde para la reparación. B: Los dímeros de timina son solamente una de las causas de lesiones voluminosas. C, D: La nucleasa de escisión es un complejo proteico necesario para desenrollar al DNA y eliminar la lesión. La polimerasa y la ligasa llenan el hueco (las pol δ y ε en los eucariotas).
14. **B** Estos enzimas catalizan el primer paso del proceso. A: Las bases metiladas y otras bases modificadas químicamente también pueden ser eliminadas. C, E: Estas propiedades son características de otros sistemas de reparación. D: El azúcar-fosfato abásico debe ser eliminado.
15. Este proceso ha sido estudiado en *E. coli*. El DNA se metila en la A de la secuencia GATC. Puesto que se trata de un palíndromo, ambas hebras se metilan. La metilación tiene lugar después de que las bases no metiladas hayan sido incorporadas al DNA. Durante la síntesis, el DNA permanecerá semimetilado durante un corto período de tiempo, hasta que la metilasa reconoce la nueva hebra y añade el grupo metilo. El sistema de reparación de apareamientos erróneos reconoce el estado de semimetilación y puede eliminar el desapareamiento en la hebra no metilada (nueva). Los eucariotas poseen un sistema de reparación similar, aunque los detalles del reconocimiento de la hebra nueva no son todavía conocidos.
16. La hebra codificadora del gen tiene la misma secuencia que el mRNA (a excepción de la presencia de U en lugar de T en el RNA). En la HbA, el codón en la posición 142 del mRNA es un codón de terminación, por tanto, el último aminoácido añadido es el 141. En la hemoglobina "constant spring" se ha producido una mutación puntual en el DNA, de manera que el codón 142 en el mRNA ahora codifica un aminoácido en lugar de una señal de terminación. La traducción prosigue hasta que encuentra un codón de terminación en la posición 173 (por lo tanto contiene 172 aminoácidos). Puede tratarse de una transición –pirimidina a pirimidina.



5



RNA: TRANSCRIPCIÓN Y MADURACIÓN DEL RNA

Francis J. Schmidt

5.1 VISIÓN GENERAL 208

5.2 MECANISMOS DE LA TRANSCRIPCIÓN 208

La transcripción es el proceso inicial de síntesis de RNA 208
Secuencias de señalización del DNA marcan los lugares de inicio de la síntesis de RNA 209
La RNA polimerasa cataliza el proceso de transcripción 209
Etapas de la transcripción en los procariotas 211
- Reconocimiento de los promotores 211
- Iniciación de la síntesis 212
- Elongación 212
- Terminación 214

5.3 LA TRANSCRIPCIÓN EN LOS EUCARIOTAS 214

Naturaleza de la cromatina activa 214
La activación de la transcripción se realiza mediante el reclutamiento de la RNA polimerasa 215
- Intensificadores 216

Transcripción por la RNA polimerasa II 216
- Promotores de la síntesis de mRNA 216

Transcripción por la RNA polimerasa I 218
Transcripción por la RNA polimerasa III 218
Principios comunes en la acción de la RNA polimerasa 219

5.4 MADURACIÓN DEL RNA 220

El RNA de transferencia se modifica por corte, adición y modificación de bases 221
- Corte 221
- Adiciones 221
- Nucleósidos modificados 221

La maduración del RNA ribosómico libera los diferentes RNA a partir de un precursor más largo 221
La maduración del RNA mensajero requiere el mantenimiento de la secuencia codificadora 222
La RNA polimerasa II recluta enzimas de modificación durante la transcripción en los eucariotas 223
- Síntesis del casquete 225
- Eliminación de intrones de precursores de mRNA 225
- Poliadenilación 226

Las mutaciones en las señales de corte y empalme son causa de enfermedades en humanos 227
El corte y empalme alternativos del pre-mRNA puede dar lugar a múltiples proteínas a partir de una única secuencia de DNA codificadora. 227

5.5 EXPORTACIÓN DEL RNA DEL NÚCLEO 228

5.6 REPARACIÓN DEL DNA ACOPLADA A LA TRANSCRIPCIÓN 228

5.7 NUCLEASAS Y RECAMBIO DEL RNA 229

BIBLIOGRAFÍA 230

PREGUNTAS 230

RESPUESTAS 232

APLICACIONES CLÍNICAS

5.1 Antibióticos y toxinas que interfieren con la RNA polimerasa 211
5.2 Síndrome del cromosoma X frágil: ¿Una enfermedad de la cromatina? 215
5.3 Intervención de factores de transcripción en la carcinogénesis 217
5.4 La talasemia se debe a defectos en la síntesis del RNA mensajero 224
5.5 Autoinmunidad en las enfermedades del tejidoconjuntivo 225
5.6 Síndrome de Cockayne: Transcripción acoplada a la reparación del DNA 229

5.1 VISIÓN GENERAL

La síntesis de una molécula de RNA consiste en la copia de una de las hebras de la secuencia molde, utilizando el apareamiento de Watson y Crick entre los nucleótidos del molde (normalmente DNA) y los nucleótidos que son incorporados al **transcrito**. La iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa es tal vez el aspecto más importante en el control de la expresión génica. La iniciación de la transcripción requiere secuencias de DNA especializadas denominadas **promotores**, que señalan dónde debe empezar la síntesis del RNA. El reconocimiento de las secuencias del promotor requiere contactos moleculares entre el DNA y **factores** proteicos. Estos factores se unen a la vez a la RNA polimerasa y a las bases del DNA a través de puentes de hidrógeno y otros tipos de contactos. Durante la elongación, la **maduración del RNA** elimina, añade o modifica nucleótidos en el transcrito primario. Estas reacciones de modificación se producen simultáneamente con la trascripción. Es decir, tienen lugar en partes del transcrito, mientras que las secuencias de más abajo todavía están siendo transcritas.

5.2 MECANISMOS DE LA TRANSCRIPCIÓN

La transcripción es el proceso inicial de síntesis de RNA

La **transcripción** es el proceso de síntesis de cadenas de RNA a partir de moldes de DNA. La reacción general de la transcripción es la siguiente:

$$\text{Molde de DNA} + n(\text{NTP}) \longrightarrow \text{pppN(pN)}_{n-1} + (n-1)\text{PP}_\text{i} + \text{Molde de DNA}$$

Los enzimas que catalizan esta reacción son las RNA polimerasas; es importante señalar que, como es el caso de las DNA polimerasas, las RNA polimerasas dependen absolutamente de un molde. Sin embargo, y a diferencia de las DNA polimerasas, las **RNA polimerasas** no requieren una molécula que haga de cebador. Desde el punto de vista energético son destacables dos aspectos. En primer lugar, el fosfato α en 5′ del ribonucleósido trifosfato se convierte en un enlace fosfodiéster a partir de un anhídrido fosfórico, con un cambio de energía libre ($\Delta G'$) de aproximadamente 3 kcal (12,5 kJ) mol^{-1} en condiciones estándar. En segundo lugar, el pirofosfato liberado, PP_i, se escinde en dos fosfatos por acción de la pirofosfatasa, de tal manera que su concentración es baja y, por consiguiente, la formación del enlace fosfodiéster está favorecida en relación a las condiciones estándar (véase p. 541).

Dada la necesidad de un molde de DNA para la síntesis del RNA, la transcripción eucariótica tiene lugar en el núcleo o en la matriz mitocondrial. En el núcleo, la síntesis de rRNA se realiza en el nucleolo, mientras que el mRNA y el tRNA se sintetizan en el nucleoplasma. La transcripción procariótica tiene lugar en el DNA celular, localizado en una región relativamente pequeña de la célula. La transcripción del DNA de los plásmidos ocurre, claro está, con independencia del cromosoma.

Durante la transcripción se producen cambios estructurales en el DNA. En los cromosomas politénicos de *Drosophila*, los genes transcripcionalmente activos aparecen al microscopio óptico como engrosamientos diferenciados de la cromatina condensada e inactiva. Además, el patrón de nucleosomas de los genes activos se encuentra alterado, y la cromatina activa es más accesible a los agentes químicos o a los enzimas. Tanto en los procariotas como en los eucariotas, la doble hélice del DNA se abre (desenrolla) transitoriamente, a medida que el complejo de transcripción se desplaza por el DNA.

La apertura y el **desenrollamiento** son necesarios porque el DNA es una doble hélice. Si la cadena de RNA se copiara a partir del DNA sin dicho desenrollamiento, el complejo de transcripción y el extremo creciente de la cadena de RNA deberían enrollarse alrededor de la doble hélice del DNA una vez cada 10 pares de bases durante su desplazamiento desde el principio hasta el final del gen. Este mecanismo haría que la cadena de RNA recién sintetizada se enrollara alrededor de la doble hélice del DNA. La abertura y desenrollamiento locales del DNA permite solventar este problema antes de que se presente, haciendo posible que la transcripción tenga lugar en una sola cara o lado del DNA. Por otra parte, la abertura de los pares de bases del DNA durante la transcripción permite el apareamiento de bases de Watson y Crick entre el DNA molde y el RNA que se está sintetizando.

El proceso de transcripción se divide generalmente en tres partes: la **iniciación** se refiere al reconocimiento de un punto de comienzo de un gen activo a cargo de la RNA polimerasa y a la puesta en marcha del proceso de formación de enlaces; la **elongación** consiste en la síntesis propiamente dicha de la cadena de RNA; y va seguida de la **finalización** y la **liberación** de la cadena.

Secuencias de señalización del DNA marcan los lugares de inicio de la síntesis de RNA

La mayor parte de las secuencias del genoma humano nunca son transcritas a RNA. Incluso en las bacterias, donde casi todo el DNA especifica productos génicos, no se expresan todos los genes al mismo tiempo. Por lo tanto, las moléculas de RNA polimerasa deben reconocer donde se encuentran los genes e ignorar el gran exceso de información inútil.

La **iniciación de la transcripción** comienza con el reconocimiento de la secuencia de un promotor en el molde de DNA. Los promotores se encuentran a corta distancia, del lado 5′, del nucleótido donde empieza la transcripción. Los diferentes promotores de un organismo contienen secuencias similares. En la Figura 5.1 se muestra un ejemplo de varios promotores bacterianos alineados para mostrar la conservación de la secuencia entre ellos. Se encuentran **secuencias conservadas** tanto en los promotores procarióticos como en los eucarióticos. Las secuencias del DNA que estimulan la transcripción, pero que se encuentran más alejadas del sitio de iniciación se denominan **potenciadores** o **intensificadores**. Los potenciadores estimulan la síntesis de algunos RNA procarióticos y de la mayoría o la totalidad de los mRNA eucarióticos. Las secuencias intensificadoras pueden estimular la transcripción tanto si están localizadas al principio, a la mitad o al final del gen. La secuencia intensificadora debe estar en la misma molécula de DNA (cromosoma) que el gen transcrito (en términos genéticos, en posición *cis*), pero puede funcionar en cualquier orientación y a una distancia variable de su promotor. Los intensificadores actúan uniendo factores proteicos específicos, llamados activadores. La unión de un activador a un intesificador produce un cambio estructural en el molde de DNA (a menudo la formación de un bucle o la curvatura) que permite la interacción del activador con otros factores o con la propia RNA polimerasa. Esta interacción facilita la transcripción, pues permite "reclutar" a la RNA polimerasa para formar el complejo de iniciación.

La RNA polimerasa cataliza el proceso de transcripción

Las **RNA polimerasas** sintetizan RNA en dirección 5′→3′ a partir de un molde de DNA. A este respecto son comparables a las DNA polimerasas dependientes de

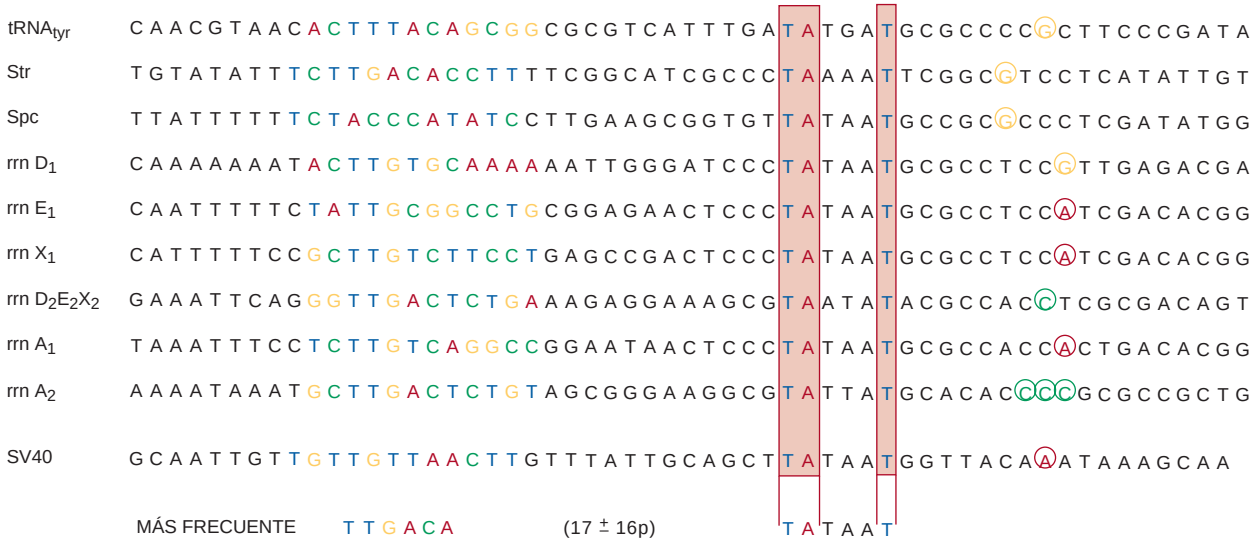


FIGURA 5.1
Determinación de una secuencia consenso para promotores procarióticos.
Una fracción del conjunto de datos utilizados para la identificación de la secuencia consenso de la actividad promotora en *E. coli*. La región −10 (llamada a veces caja Pribnow) está sombreada en rojo, mientras que la región −35 está coloreada en azul. Obsérvese que ninguno de los promotores individuales posee la secuencia consenso completa. *Adaptado de Rosenberg, M. y Court, D.* Annu. Rev. Genet. *13:319, 1979.*

TABLA 5.1 Propiedades comparativas de algunas RNA polimerasas

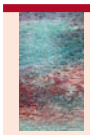
	Nuclear				
	***I*(*A*)**	***II*(*B*)**	***III*(*C*)**	***Mitocondrial***	**E. coli**
Subunidades de elevada masa molecular[a]	195–197 117–126	240–214 140	155 138	65	160 (β') 150 (β)
Subunidades de baja masa molecular	61–51 49–44 29–25 19–16,5	41–34 29–25 27–20 19.5 19 16,5	89 70 53 49 41 32 29 19		86 (σ) 40 (α) 10 (ω)
Formas variables	2–3 tipos	3–4 tipos	2–4 tipos	1	1
Especialización	Nucleolar; rRNA	mRNA RNA vírico	tRNA 5S rRNA	Todo el mtRNA	Ninguno
Inhibición por α-amanitina	Insensible (>1 mg mL^{-1})	Muy sensible ($10^{-9} - 10^{-8}$ M)	Sensible ($10^{-5} - 10^{-4}$ M)	Insensible pero sensible a la rifampicina	Sensible a la rifampicina

[a] Masa molecular $\times 10^{-3}$.

molde, tratadas en el Capítulo 4. Sin embargo, y a diferencia de las DNA polimerasas, las RNA polimerasas inician la polimerización en una secuencia promotora sin que sea necesaria la existencia de un cebador de DNA o RNA.

Las RNA polimerasas de células procarióticas y eucarióticas son grandes complejos enzimáticos cuyos mecanismos se conocen sólo en parte. La RNA polimerasa de *Escherichia coli*. se compone de cinco subunidades con una masa molecular total de más de 500.000 (Tabla 5.1). Dos subunidades α, una subunidad β y una subunidad β' forman el **enzima núcleo**, capaz de llevar a cabo fielmente la transcripción, pero no la síntesis específica (es decir, iniciada por promotor) de RNA. La adición de una quinta subunidad proteica, denominada σ, forma el **holoenzima,** que es capaz de sintetizar específicamente RNA *in vitro* e *in vivo*. La implicación de σ en el reconocimiento específico de los promotores ha podido ser demostrada gracias a diversos estudios bioquímicos. **Factores** σ específicos pueden reconocer diferentes clases de genes. Por ejemplo, un factor σ específico reconoce los promotores de los genes que se inducen como resultado de un choque térmico. En bacterias esporuladoras se sintetizan factores σ que reconocen los genes inducidos durante la esporulación. Algunos bacteriófagos (virus que infectan bacterias) sintetizan factores σ que permiten el aprovechamiento de la RNA polimerasa celular para la transcripción del DNA vírico.

El antibiótico **rifampicina** (utilizado en el tratamiento de la tuberculosis) inhibe las RNA polimerasas procarióticas comunes, uniéndose a la subunidad β (Apli. Clín. 5.1). Las RNA polimerasas nucleares eucarióticas son inhibidas específicamente por la **α-amanitina**, sintetizada por el hongo venenoso *Amanita phalloides*. Se pueden distinguir tres clases de RNA polimerasas nucleares ya que concentraciones muy bajas de α-amanitina inhiben la síntesis de mRNA y de algunos pequeños RNA nucleares (snRNA); concentraciones más elevadas inhiben la síntesis de tRNA y otros pequeños RNA nucleares, designados por snRNA, mientras que la síntesis de rRNA no es inhibida ni siquiera a altas concentraciones de la toxina. Los enzimas purificados son inhibidos diferencialmente por la α-amanitina, ello hace posible concluir que el mRNA es sintetizado por la RNA polimerasa II, la más sensible de las formas purificadas de la RNA polimerasa. La síntesis del tRNA, del RNA 5S, y de algunos snRNA corre a cargo de la RNA polimerasa III. La transcripción de los genes del los rRNA ribosómicos corre a cargo de la RNA polimerasa I, concentrada en el nucleolo. (Los números se refieren al orden de elución de los enzimas en una columna cromatográfica.) Todos los enzimas son estructuralmente muy complejos (Tabla 5.1). Una RNA polimerasa mitocondrial es responsable de la síntesis de las especies de mRNA, tRNA y rRNA mitocondriales. Este enzima, al igual que la RNA polimerasa bacteriana, es inhibido por la rifampicina (Apli. Clín. 5.1).



APLICACIÓN CLÍNICA 5.1

Antibióticos y toxinas que interfieren con la RNA polimerasa

La RNA polimerasa es un enzima esencial para la vida, ya que el primer paso de la expresión génica lo constituye la transcripción. La ausencia de RNA polimerasa implica la ausencia de cualquier otro enzima, como lo demuestran dos sustancias naturales, inhibidoras de la RNA polimerasa, que provocan la muerte del organismo. El "hongo venenoso" *Amanita phalloides* causa anualmente varias muertes, a pesar de los consejos dirigidos a los buscadores de setas aficionados (tiene reputación de poseer un delicioso sabor). La toxina más letal, la α-amanitina, inhibe la subunidad mayor de la RNA polimerasa II eucariótica, causando la inhibición de la síntesis de mRNA. El envenenamiento empieza con síntomas gastrointestinales relativamente leves, seguidos 48 horas más tarde por fallo hepático generalizado, consecuencia de la degradación de mRNA esenciales y de sus proteínas, que no pueden ser reemplazados por moléculas de nueva síntesis. La única terapia posible es de soporte, incluido el transplante de hígado, pero esta última es una medida desesperada de dudosa eficacia.

Una toxina más benigna (al menos desde el punto de vista de nuestra propia especie) es el antibiótico rifampicina, que inhibe las RNA polimerasas de un gran número de especies bacterianas, y es particularmante útil en el tratamiento de la tuberculosis. Su agente causante, *Mycobacterium tuberculosis*, es insensible a muchos antibióticos de uso común, pero es sensible a la rifampicina, producto de un estreptomiceto del suelo. Dado que la RNA polimerasa de mamífero es tan distinta de la procariótica, se puede inhibir esta última sin gran toxicidad para el huésped. Ello proporciona al fármaco un buen índice terapéutico; es decir, la capacidad de tratar una enfermedad sin causar daños intolerables al paciente. La mejora en las medidas de salud pública, junto con la aplicación del antibiótico rifampicina y el antimetabolito isoniazida ha reducido en gran medida la morbilidad de la tuberculosis en los países industrializados. Por desgracia, la enfermedad sigue siendo endémica en poblaciones pobres de los Estados Unidos y de otros países. Un gran número de individuos con afectaciones inmunológicas, especialmente los pacientes de SIDA, están aquejados de tuberculosis activas.

Mitchel, D. H. Amanita mushroom poisoning. *Annu. Rev. Med.* 31:51, 1980; Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S. y Taylor, P. (Eds.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics,* 8th ed. New York: Pergamon Press, 1990, pp. 129–130; DeCock, K. M., Soro, B., Colibaly, I. M. y Lucas, S. B. Tuberculosis and HIV infection in sub-Saharan Africa. *JAMA* 268:1581, 1992.

Etapas de la transcripción en los procariotas

El DNA cromosómico se transcribe normalmente en una sola dirección, tal como se ilustra en el siguiente esquema:

DNA: 5′ ⟶ 3′
DNA: 3′ ⟶ 5′
RNA: 5′ ⟶ 3′ ⋯

La hebra de DNA que sirve de molde para la síntesis del RNA es complementaria del transcrito de RNA. Convencionalmente, la hebra molde suele ser la "inferior" al escribir la secuencia de un DNA de doble cadena. La otra hebra, la hebra "superior" tiene la misma dirección que el transcrito cuando se lee en dirección de 5′ a 3′, y a veces se denomina hebra codificante. Cuando en este libro se muestra una sola hebra de DNA, se representa la hebra codificante. Su secuencia puede convertirse en el transcrito de RNA simplemente sustituyendo las timinas (T) por uracilos (U).

Reconocimiento de los promotores

En los procariotas, la transcripción empieza con la unión específica de la RNA polimerasa al promotor de un gen (Figuras 5.2 y 5.3). El holoenzima de la RNA polimerasa se une a una cara del DNA, que se extiende a lo largo de aproximadamente 45 pares de bases del lado 5′ y 10 pares de bases del lado 3′ en torno del inicio de la transcripción. En esta región se encuentran dos secuencias cortas altamente conservadas (Figura 5.1). Una secuencia está localizada aproximadamente a 10 bp más arriba del inicio de la transcripción (llamada a veces "**caja −10** o de **Pribnow**), cuya **secuencia consenso** es:

T*A*TAAT*

Las posiciones marcadas con un asterisco son las más conservadas; de hecho, el último residuo de T se encuentra en todos los promotores de *E. coli*.

Mas arriba de la secuencia de Pribnow, o "−10", se encuentra una segunda secuencia consenso. Esta "**secuencia −35**"

T*T*G*ACA

está centrada aproximadamente a 35 pb más arriba del inicio de transcripción; los nucleótidos con asterisco son los más conservados. La distancia entre las secuencias −35 y −10 es crucial, y habitualmente es de 17 pares de bases. Tal como se mues-

tra en la Figura 5.1, las secuencias TTGACA y TATAAT son asimétricas, es decir, son distintas de su secuencia complementaria. Por lo tanto, la propia secuencia del promotor dirige la transcripción en una sola dirección.

¿Qué consecuencias tiene la presencia de las secuencias consenso sobre los genes? La mediciones de la afinidad de unión de la RNA polimerasa y la eficiencia de la iniciación con diferentes secuencias de promotores han demostrado que los promotores más activos son los más parecidos a las secuencias consenso. El grado de homología de los promotores con las secuencias consenso muestra un claro paralelismo con la "fuerza" del promotor; es decir, con su capacidad cinética para iniciar la transcripción con RNA polimerasa purificada.

Las bases que flanquean las secuencias "−35" y "−10", las cercanas al punto de inicio de la transcripción y las localizadas cerca de la posición "−16" están débilmente conservadas. En algunas de estas regiones poco conservadas, es posible que la RNA polimerasa necesite que un nucleótido particular no esté presente o que haya variaciones locales en la estructura helicoidal del DNA. Los promotores de los genes del choque térmico de *E. coli* tienen diferentes secuencias consenso en las regiones "−35" y "−10", lo que está de acuerdo con el hecho de que sean reconocidas por un factor σ diferente.

Un transcrito de RNA suele empezar con un ribósido trifosfato de purina; es decir, pppG ⋯ o pppA ⋯, pero también se han observado pirimidinas en la primera posición (Figura 5.1). La posición del inicio de la transcripción es ligeramente distinta en los diversos promotores, pero normalmente se encuentra 5-8 pb más abajo de la T invariable de la secuencia de Pribnow.

Inicio de la síntesis

Son necesarios dos pasos cinéticamente distintos para que la RNA polimerasa inicie la síntesis de una cadena de RNA (Figura 5.2 a, b). En el primer paso, el holoenzima de la RNA polimerasa se une al DNA promotor de forma relativamente débil, formando un "**complejo cerrado**". En el segundo paso, el holoenzima forma un "**complejo abierto**" unido más fuertemente y caracterizado por una abertura local de aproximadamente 10 pares de bases de la doble hélice del DNA. Dado que la secuencia consenso de Pribnow es rica en A-T, puede facilitar el desenrollamiento local pues sus pares de bases se separan más fácilmente durante la abertura. Tal como ya se ha comentado en el Capítulo 2, la abertura de 10 pb de DNA es topológicamente equivalente a la relajación de una vuelta superhelicoidal negativa. Como es predecible a partir de esta observación, la actividad de algunos promotores depende del estado topológico del molde de DNA. Algunos promotores son más activos cuando el DNA está altamente superenrollado, mientras que otros son más activos cuando la densidad superhelicoidal es baja. El trifosfato inicial se une al DNA desenrollado y a continuación la RNA polimerasa forma el primer enlace fosfodiéster. El enzima se traslada a la siguiente posición (éste es el paso inhibido por la rifampicina) y continúa la síntesis. Durante la formación del enlace inicial o poco después de ella, se libera el factor σ y el enzima entra en el modo de elongación. Otras moléculas de RNA polimerasa pueden interaccionar entonces con el promotor para que el gen pueda transcribirse muchas veces (Figura 5.3).

Elongación

La RNA polimerasa continúa el ciclo de unión–formación de enlace–translocación a una velocidad aproximada de 40 nucleótidos por segundo. Sin embargo, existen muchos ejemplos en los cuales la RNA polimerasa efectúa una pausa o reduce la velocidad en secuencias concretas, generalmente repeticiones invertidas (secuencias palindrómicas de nucleótidos). Como se verá más adelante, estas pausas pueden dar lugar a la finalización de la transcripción.

A medida que la RNA polimerasa se desplaza sobre la doble hélice, sigue separando las dos hebras del molde de DNA. Tal como se muestra en la Figura 5.2 *c,d*, este proceso permite a la hebra molde aparearse con la cadena naciente de RNA. Así, un único mecanismo de transferencia de información (apareamiento de Watson y Crick) sirve para distintos procesos: replicación del DNA, reparación del DNA y transcripción de la información genética en RNA (Como se verá en el Capítulo 6, el apareamiento también es esencial para la traducción). Los procesos de desenrollamiento y restablecimiento de la doble hélice del DNA están facilitados por las topoisomerasas I y II, que forman parte del complejo de transcripción.

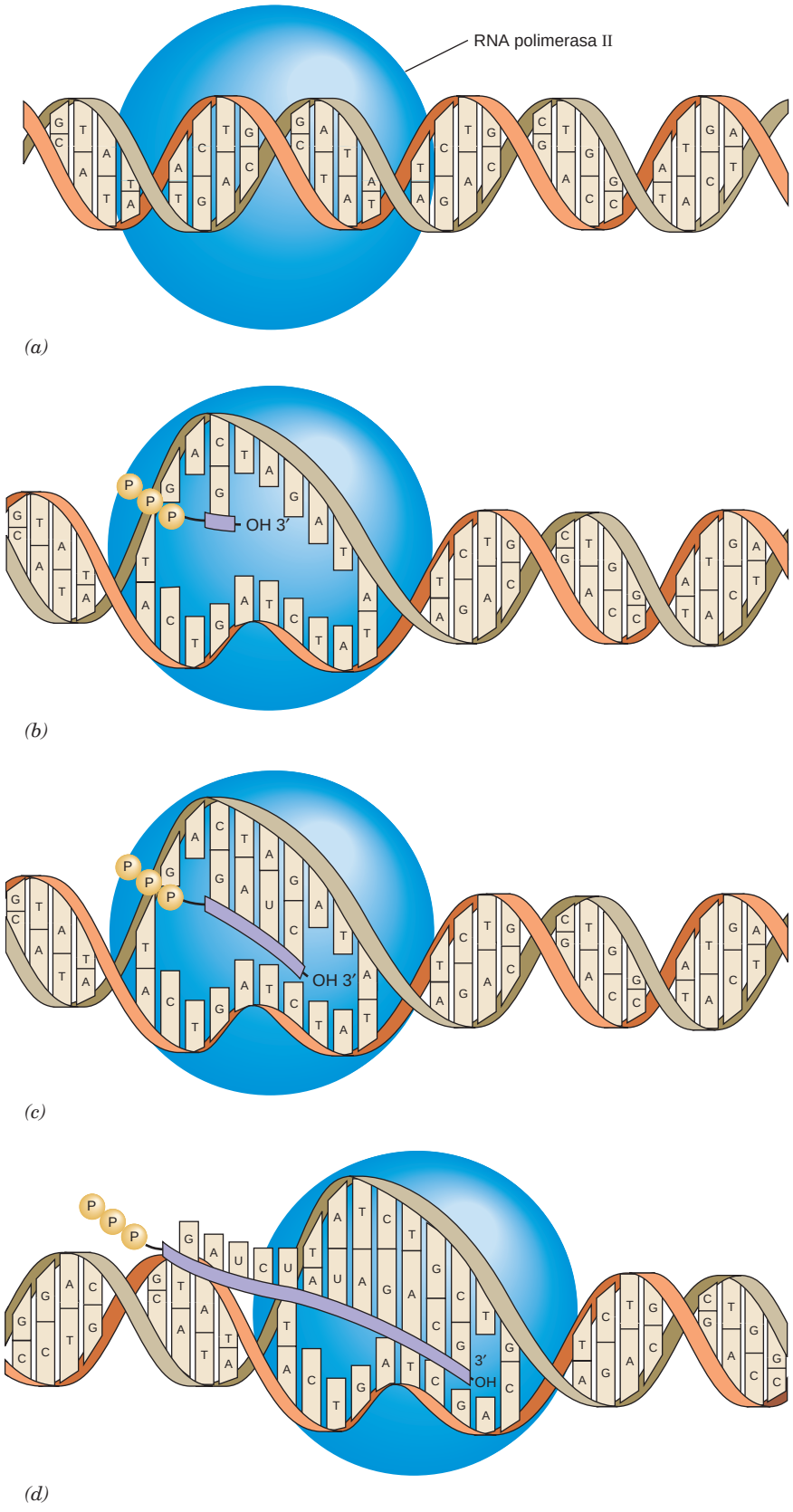


FIGURA 5.2
Procesos iniciales de la transcripción procariótica.
(*a*) Reconocimiento: la RNA polimerasa con el factor "sigma" se fija a una región promotora del DNA en una configuración "cerrada". (*b*) Iniciación: el complejo adopta una configuración "abierta" y el primer nucleósido trifosfato se alinea con el DNA. (*c*) Se forma el primer enlace fosfodiéster y se libera el factor "sigma". (*d*) Elongación: la síntesis del RNA naciente avanza con el movimiento de la RNA polimerasa a lo largo del DNA. Se vuelve a formar la doble hélice.

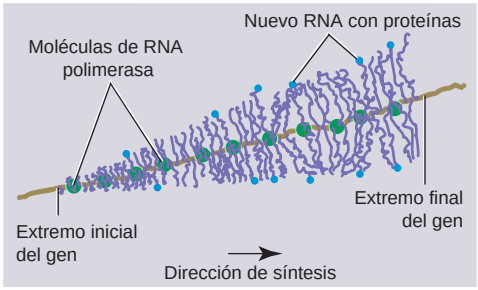


FIGURA 5.3
Transcripción simultánea de un gen por muchas RNA polimerasas, mostrando la longitud creciente de las moléculas de RNA naciente.
Cortesía del Dr. O. L. Miller, University of Virginia. Reproducido con autorización de Miller, O. L. y Beatty, B. R. J. Cell Physiol. 74:225, 1969.

Los cambios en el complejo de transcripción durante la fase de elongación pueden afectar a los fenómenos posteriores de terminación. Estos cambios dependen de la unión de otra proteína celular (proteína NusA) a la RNA polimerasa núcleo. La falta de unión de este factor proteico puede dar lugar a un aumento de la frecuencia de terminación y, en consecuencia, a una reducción en el nivel de expresión génica.

Terminación

El complejo de la RNA polimerasa también reconoce los extremos de los genes (Figura 5.4). La terminación de la transcripción puede darse de dos maneras, según sea dependiente o independientemente del factor proteico ρ (rho). Los terminadores se clasifican, pues, en independientes de ρ y en dependientes de ρ.

Los **terminadores independientes de rho** son los mejor caracterizados (Figura 5.4). Se encuentra una secuencia consenso: un palíndromo (repetición invertida) rico en G-C que precede a una secuencia de 6–7 residuos de U en la cadena de RNA. Como resultado, la cadena de RNA forma una estructura en horquilla que precede a la secuencia de U. La estructura secundaria de la horquilla es crucial para la terminación; las mutaciones por cambio de bases que impiden el apareamiento también disminuyen el grado de finalización. Los terminadores más eficientes son los más ricos en G-C, es decir, los más estables. El mantenimiento de la estructura en horquilla después de la terminación estabiliza el mRNA procariótico frente a la degradación nucleolítica.

Los **finalizadores dependientes de rho** están peor caracterizados. El factor Rho es una proteína hexamérica con actividad ATPasa intrínseca dependiente de RNA. Las secuencias de los sitios de terminación dependientes de ρ contienen residuos de C distribuidos regularmente en una región relativamente poco estructurada del transcrito. El RNA naciente se enrosca alrededor del factor ρ mientras que la hidrólisis de ATP produce la disociación del transcrito del molde.

Los ribosomas procarióticos suelen unirse al mRNA naciente que está todavía en proceso de transcripción. Este acoplamiento entre transcripción y traducción es importante en el control génico por atenuación (véase el Capítulo 8).

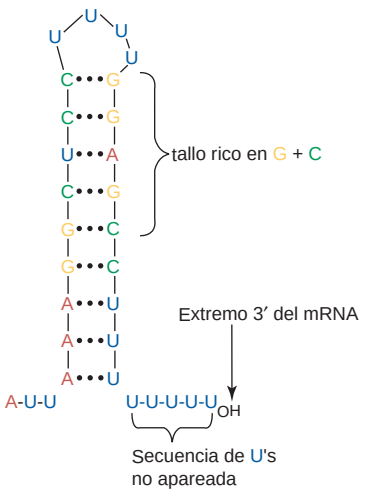


FIGURA 5.4
Estructura de tallo y bucle del transcrito de RNA que determina la finalización de la transcripción independiente del factor rho.
Obsérvense los dos componentes de la estructura: el tallo rico en G + C y el bucle, seguidos por una secuencia de U.

5.3 | LA TRANSCRIPCIÓN EN LOS EUCARIOTAS

La iniciación de la transcripción en los eucariotas y en los procariotas difiere sustancialmente. Aunque la definición del promotor es la misma —información en la secuencia del DNA que especifica el inicio de la transcripción— los sucesos moleculares requeridos para el inicio de la transcripción son más complejos. En primer lugar, la cromatina que contiene la secuencia promotora debe hacerse accesible a la maquinaria de transcripción. Segundo, **factores de transcripción** distintos de la RNA polimerasa deben unirse a secuencias del DNA del promotor para que el gen sea activo. Tercero, los **intensificadores** unen otros factores proteicos (activadores) que estimulan la transcripción.

Los factores de transcripción eucarióticos se unen al DNA y fijan la RNA polimerasa al promotor. En cambio, los factores ρ bacterianos no se unen al DNA sin haberse unido previamente a la RNA polimerasa núcleo. La RNA polimerasa eucariótica consiste en tres formas enzimáticas distintas, cada una capaz de transcribir una clase distinta de RNA celular. Por el contrario, todos los genes procarióticos son transcritos por una única forma de RNA polimerasa núcleo, aunque diferentes factores ρ están implicados en la iniciación de diferentes genes.

Naturaleza de la cromatina activa

En los Capítulo 4 y 8 se describe la organización de los cromosomas eucarióticos. Aunque la cromatina esté organizada en **nucleosomas** con independencia de que pueda o no ser transcrita, un gen activo tiene en general una conformación "más laxa" que la cromatina transcripcionalmente inactiva. Esta diferencia es más acusada en las secuencias promotoras, en las cuales se encuentran regiones desprovistas de nucleosomas (Figura 5.5). La ausencia de nucleosomas se manifiesta experimentalmente por la mayor sensibilidad de las secuencias del promotor a agentes externos

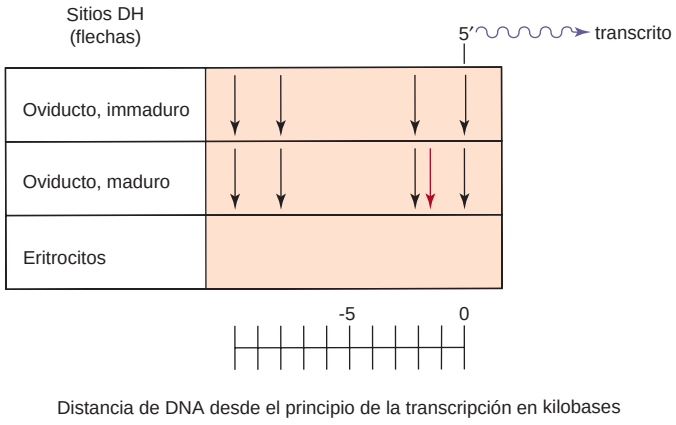
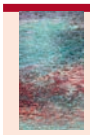


FIGURA 5.5
Lugares hipersensibles a la DNasa (DH) más arriba del promotor del gen de la lisozima de pollo, una típica unidad transcripcional eucariótica.
Las flechas indican los lugares hipersensibles, es decir, secuencias de DNA situadas alrededor del gen de la lisozima que no forman nucleosomas. Algunos lugares hipersensibles se encuentran en el promotor, independientemente de que el oviducto esté sintetizando lisozima. La síntesis de lisozima viene acompañada por la apertura de un nuevo lugar hipersensible en el oviducto maduro. Por el contrario, no existen lugares hipersensibles en eritrocitos nucleados, que nunca sintetizan lisozima. *Adaptado de Elgin, S. C. R.* J. Biol. Chem. *263:1925, 1988.*

que cortan el DNA, como por ejemplo la DNasa I. Esta mayor sensibilidad de las secuencias del promotor (denominada **hipersensibilidad a la DNasa I)**, asegura que los factores de transcripción puedan unirse a las secuencias reguladoras apropiadas. A pesar de que las secuencias transcritas de un gen puedan estar organizadas en nucleosomas, éstos están unidos más débilmente que en un gen inactivo. Esta estructura más laxa se debe a la acetilación de las histonas por la acetil transferasa de histonas, que transfiere grupos acetilo del acetil-CoA a las histonas, especialmente al N-terminal de las histonas H4 y H3. Finalmente, la metilación puede inactivar la transcripción del DNA (véase Apli. Clín. 5.2). En general, para que tenga lugar la transcripción es necesario, aunque no suficiente, que la cromatina esté parcialmente desplegada.

La activación de la transcripción se realiza mediante el reclutamiento de la RNA polimerasa

Los factores proteicos eucarióticos, con independencia de la secuencia a la que se unan, actúan de una forma fundamentalmente distinta del factor σ de *E. coli*. En lugar de entrar a formar parte primero de un complejo proteico y después buscar la secuencia de DNA pertintente, los factores se unen a un lugar (secuencia) específico del DNA y luego se unen a la RNA polimerasa (con o sin la participación de factores mediadores). Este mecanismo se denomina "reclutamiento". El reclutamiento tiene una importancia menor en los procariotas y es el mecanismo principal en los eucariotas.



APLICACIÓN CLÍNICA 5.2
Síndrome del cromosoma X frágil: ¿Una enfermedad de la cromatina?

El síndrome del cromosoma X frágil es una de las formas más comunes de retraso mental congénito, que afecta a uno de cada 1250 hombres y a una de cada 2000 mujeres. La inactivación del gen *FMR1*, situado en el cromosoma X produce una gran variedad de sintomas anatómicos y neurológicos. La genética de este síndrome es compleja debido al mecanismo molecular de la mutación X-frágil.

La fragilidad del cromosoma X es el resultado de la expansión de la secuencia trinucleotídica repetida, CGG, que se encuentra en la región 5′ no traducida del gen *FMR1*. Normalmente esta región presenta 30 copias de esta repetición, aunque individuos normales llegan a presentar hasta 200. Los individuos con el síndrome del cromosoma X frágil presentan desde 200 hasta varios miles de copias de esta repetición. La genética compleja de esta enfermedad viene dada por el potencial de expansión, generación tras generación de las secuencias repetidas CGG.

La presencia de un número anormalmente alto de repeticiones CGG induce una metilación extensiva del DNA de la región promotora del gen *FMR1*. El DNA metilado es transcripcionalmente inactivo, por lo tanto no se sintetiza el mRNA del gen FMR1. La ausencia de la proteína FMR1 da lugar a la patología de la enfermedad.

La proteína FMR1 está localizada normalmente en el citoplasma de todos los tejidos del feto en las primeras etapas del desarrollo y, más adelante, especialmente en el cerebro. Su secuencia muestra algunas caracteristicas de una proteína de unión a RNA. Una posibilidad es que, durante el desarrollo, esta proteína colabore en la traducción de mRNA específicos del cerebro.

Warren, S. L. y Nelson, D. L. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *JAMA* 271:536, 1994; y Caskey, C. T. Triple repeat mutations in human disease. *Science* 256:784, 1992.

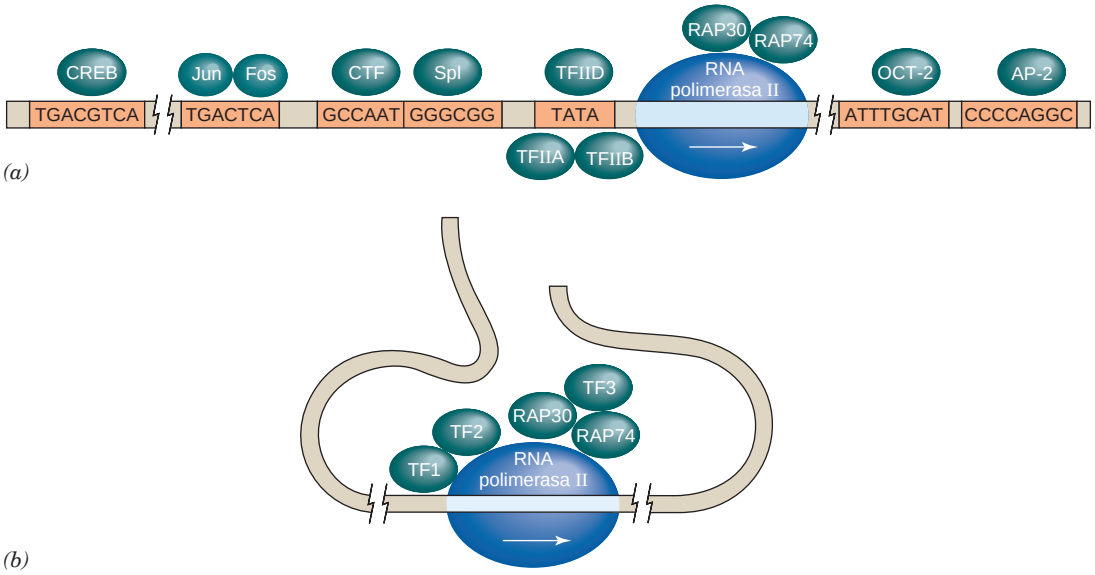


FIGURA 5.6
Interacción de los factores de transcripción con los promotores. Un gran número de factores de transcripción interaccionan con regiones promotoras en los eucariotas. (*a*) Disposición hipotética de una serie de factores que interaccionan con secuencias específicas de DNA cercanas al promotor, incluido TFIID, que se une a la caja TATA, y las proteínas Jun y Fos, que son protooncogenes (Apli. Clín. 5.3). La representación de la figura no supone que todos los factores se unan simultáneamente al promotor. (*b*) Una de las formas propuestas para la interacción de los factores de unión al DNA, entre sí y a la RNA polimerasa. Si bien este modelo no está completamente probado, se sabe que proteínas que se unen a secuencias distantes del DNA interaccionan entre sí.
Con permiso de Mitchell, P. J. y Tijan, R. Science 245:371, 1989.

Intensificadores

Las **secuencias intensificadoras** incrementan la expresión de un gen unas 100 veces. Los factores de transcripción que se unen a las secuencias intensificadoras se denominan activadores. Las proteínas activadoras tienen dos dominios, uno que se une a la secuencia potenciadora y otro que se une a otra proteína o a la RNA polimerasa. El modelo más aceptado para explicar estos efectos supone la formación de un "bucle" que permite que el potenciador y el promotor se encuentren en estrecho contacto en el espacio, incluso si están separados por una secuencia relativamente larga de DNA (Figura 5.6).

Transcripción por la RNA polimerasa II

La **RNA polimerasa II** es la responsable de la síntesis de mRNA en el núcleo. Del estudio de un gran número de genes se han deducido varias características comunes (Figura 5.6). (1) Las secuencias de DNA que controlan la transcripción son complejas; un único gen puede estar controlado por hasta seis u ocho elementos en la secuencia del DNA, además del propio promotor (región de unión de la RNA polimerasa). Las secuencias de control actúan de manera concertada para dar un patrón de control finamente regulado. (2) El efecto de las secuencias de control sobre la transcripción está mediado por la unión de proteínas a cada uno de los elementos de secuencia. Estos factores de transcripción reconocen la secuencia nucleotídica del elemento controlador correspondiente. (3) Los factores de transcripción interactúan entre sí para reclutar a la RNA polimerasa. Las funciones de unión al DNA y de activación se encuentran en dominios separados de las proteínas. (4) La RNA polimerasa II se modifica durante las reacciones de la transcripción. La polimerasa modificada recluta otros componentes nucleares durante la fase de elongación de la transcripción, entre los que se encuentran enzimas para la maduración del RNA,

Promotores de la síntesis de mRNA

A diferencia de la RNA polimerasa procariótica, que reconoce una sola secuencia promotora, la RNA polimerasa II puede iniciar la transcripción reconociendo varias clases de **secuencias consenso** por encima del inicio de transcripción del mRNA. La primera y más importante de ellas, denominada a veces **caja TATA**, tiene la secuencia

TATA(A/T)(A/T) A

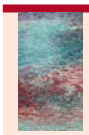
Donde los nucleótidos entre paréntesis pueden ser A o T.

La caja TATA está centrada aproximadamente a 25 pares de bases más arriba de la unidad de transcripción. Experimentos en los que se eliminó esta secuencia sugieren que es necesaria para que se produzca una transcripción eficiente; sin embargo, algunos promotores carecen de ella por completo.

Más arriba hay una segunda región de homología, que contiene la **caja CAAT,** cuya secuencia es

GG(T/C) CAATCT

Esta secuencia no está tan conservada como la secuencia TATA, y es posible que algunos promotores activos no la posean. Otras secuencias, descritas en la Figura 5.6, también puede pueden promover la transcripción. Las cajas CAAT y TATA, así como otras secuencias mostradas en la Figura 5.6, no se unen directamente a la RNA polimerasa II, sino que para llevar a cabo su función requieren la unión de **factores de trascripción** específicos. Obsérvese cómo los factores proteicos se unen no sólo a la secuencia de DNA, sino también entre ellos y a la RNA polimerasa, enzima en sí mismo de gran tamaño y complejidad. A pesar de la complejidad de las interacciones descritas, los principios enunciados anteriormente son válidos para todos los mecanismos en los que intervienen los f**actores de transcripción de clase II** conocidos, es decir, los factores que promueven la transcripción por la RNA polimerasa II. Formas mutadas de algunos de estos factores son el producto de oncogenes (Apli. Clín. 5.3).



APLICACIÓN CLÍNICA 5.3
Intervención de factores de transcripción en la carcinogénesis

La conversión de una célula normal correctamente regulada en una célula cancerosa requiere un conjunto de acontecimientos independientes cuyo resultado final es una célula transformada capaz de crecer de forma incontrolada y de metástasis. Se ha obtenido información referente a dichos procesos mediante estudios de DNA recombinante de los genes, denominados oncogenes, cuyos productos mutados o sobreexpresados contribuyen a la carcinogénesis. Los oncogenes fueron al principio identificados como productos de virus tumorales de DNA o RNA, pero también están presentes en las células normales. Los análogos normales no mutados de los oncogenes se conocen como protooncogenes. Sus productos forman parte del gran número de vías que regulan el crecimiento y la diferenciación de una célula normal; la mutación a una forma oncogénica implica un cambio que hace del producto regulador un componente menos susceptible a un control normal.

Algunos productos protooncogénicos están implicados en la transducción de señales hormonales o en el reconocimiento de factores de crecimiento celular, y su actuación se localiza a nivel citoplasmático. Otros protooncogenes actúan en el núcleo; sus productos génicos están a menudo asociados con el aparato de transcripción y son sintetizados en respuesta a estímulos de crecimiento. Es fácil imaginar cómo la sobreproducción o activación permanente de tales factores de transcripción positivos pueda colaborar en la transformación de una célula normal en célula maligna: genes transcritos normalmente a un nivel bajo o controlado podrían estar sobreexpresados a causa de un desarreglo en el mecanismo de control.

Un efecto genético más sutil en la predisposición al cáncer se da en la proteína supresora tumoral humana p53. Esta proteína es el producto de un oncogén dominante. Una sola copia del gen mutado causa el síndrome de Li–Fraumeni, una enfermedad heredada que predispone a los carcinomas de mama y córtex adrenal, sarcomas, leucemia y tumores cerebrales.

Se pueden identificar mutaciones somáticas en la p53 en alrededor de la mitad de todos los cánceres humanos. Las mutaciones suponen una pérdida de función, que afecta a la estabilidad o a la capacidad de unión al DNA de la p53. Así, el tipo salvaje de la p53 funciona como un supresor tumoral. La proteína normal ayuda al control del punto de control entre las fases G1 y S del ciclo celular, activa la reparación del DNA y en otras circunstancias conduce a la muerte celular programada (apoptosis). De esta manera, la actividad bioquímica de la p53 sirve para mantener bajo control el crecimiento celular, mantener el contenido de la información del genoma y, finalmente, eliminar las células dañadas. Todas estas funciones se opondrían a la transformación neoplásica de la célula.

Toda esta variedad de papeles son debidos a la acción de la p53 como factor de transcripción, que inhibe a algunos genes y activa a otros. Por ejemplo, la p53 inhibe la transcripción de genes con secuencias TATA, posiblemente interaccionando con el complejo formado por los factores de transcripción y la secuencia TATA. Alternativamente, la p53 es una proteína de unión a DNA específica de secuencia que promueve la transcripción de otros genes, por ejemplo los de reparación del DNA.

Se ha determinado la estructura tridimensional de la p53. Las mutaciones que se encuentran en la p53 aislada a partir de tumores afectan al dominio de unión al DNA de la proteína. Por ejemplo, casi el 20% de todos los residuos mutados implican mutaciones en dos posiciones de la p53. La estructura cristalina de los complejos proteína-DNA muestran que estos dos aminoácidos, ambos son argininas, forman puentes de hidrógeno con el DNA. La arginina 248 forma puentes de hidrógeno en el surco menor de la hélice del DNA con un oxígeno de una timina y con un nitrógeno del anillo de una adenina. La mutación rompe esta red de puentes de hidrógeno y por tanto la capacidad de la p53 de regular la transcripción.

Weinberg, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49:3713, 1989; Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. y Pavletich, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor–DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265:346, 1994; Friend, S. p43: a glimpse at the puppet behind the shadow play. *Science* 265:334, 1994; y Harris, C.C. y Hollstein, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.* 329:1318, 1993.

Transcripción por la RNA polimerasa I

Recordemos que los genes de rRNA se encuentran localizados en el **nucleolo**. Los RNA ribosómicos se sintetizan en una estructura nuclear especializada, el nucleolo, y los genes del rRNA están localizados en una región cromosómica específica, denominada el "**organizador nucleolar**". Cada unidad de transcripción contiene secuencias 28S, 5,8S y 18S, en este orden. Varios centenares de unidades de transcripción están dispuestas en tándem (una tras otra) en el cromosoma. Las unidades de transcripción están separadas por secuencias espaciadoras. Las secuencias espaciadoras contienen secuencias para la unión de la RNA polimerasa I y para **factores de transcripción de clase I**, que promueven la actividad de la RNA polimerasa I. Las unidades repetitivas contienen una copia de cada secuencia de RNA (28S, 5,8S y 18S) y están separadas una de otra por regiones espaciadoras no transcritas. La Figura 5.7 muestra un esquema de esta organización. Cada unidad repetitiva se transcribe como un todo, generando un transcrito primario que contiene una copia de cada una de las secuencias 28S, 5,8S y 18S, lo que asegura la síntesis de cantidades equimolares de cada uno de estos tres rRNA. El transcrito primario es modificado a continuación por ribonucleasas y enzimas de modificación para generar las tres moléculas maduras. La terminación de la transcripción se produce dentro de las regiones espaciadoras no transcritas, antes de que la RNA polimerasa I alcance el promotor de la siguiente unidad repetitiva.

El promotor reconocido por la RNA polimerasa I se localiza dentro de la región espaciadora no transcrita, aproximadamente desde la posición −40 a +10 y desde −150 a −110. Un factor de transcripción se une al promotor y de esta manera dirige el reconocimiento de la secuencia promotora por la RNA polimerasa I. Además, en el DNA ribosómico humano se encuentra una secuencia potenciadora a unos 250 pares de bases del promotor. La longitud de las regiones espaciadoras no transcritas y la posición del elemento potenciador varían considerablemente de un organismo a otro.

La transcripción del rRNA puede ser muy rápida, lo cual refleja el hecho de que la síntesis de ribosomas es un paso limitante en el crecimiento celular. La fosforilación de la RNA polimerasa I podría activar la transcripción especialmente rápida del rRNA, que tiene lugar durante el crecimiento embrionario o la regeneración hepática. En otras situaciones, cuando el crecimiento no es tan rápido, sólo algunas repeticiones son transcritas.

Transcripción por la RNA polimerasa III

Los principios desarrollados anteriormente para la transcripción a partir de promotores de las clases I y II son también válidos para la transcripción de los RNA 5S y el tRNA por la RNA polimerasa III. Los factores de transcripción se unen al DNA y dirigen la acción de la RNA polimerasa. Un rasgo poco común de la actividad de la RNA polimerasa III en la transcripción del RNA 5S es la localización de la secuencia de unión al factor, que se encuentra dentro del segmento de DNA que codifica el RNA. El DNA que forma la región que normalmente correspondería al promotor, es decir, que ocupa la posición inmediatamente adyacente al gen en dirección

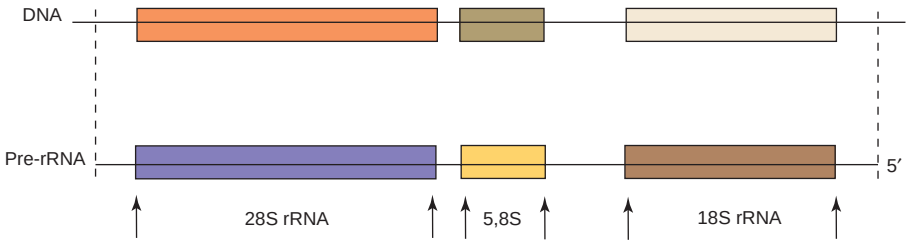


FIGURA 5.7
Estructura de una unidad de transcripción de rRNA.
Los genes de RNA ribosómico están organizados en forma de copias múltiples situadas una detrás de otra. Cada copia es transcrita por separado, y cada transcrito es modificado para dar tres especies distintas de RNA. Las secuencias promotoras y potenciadoras se localizan en las regiones no transcritas de las secuencias repetidas en tándem.

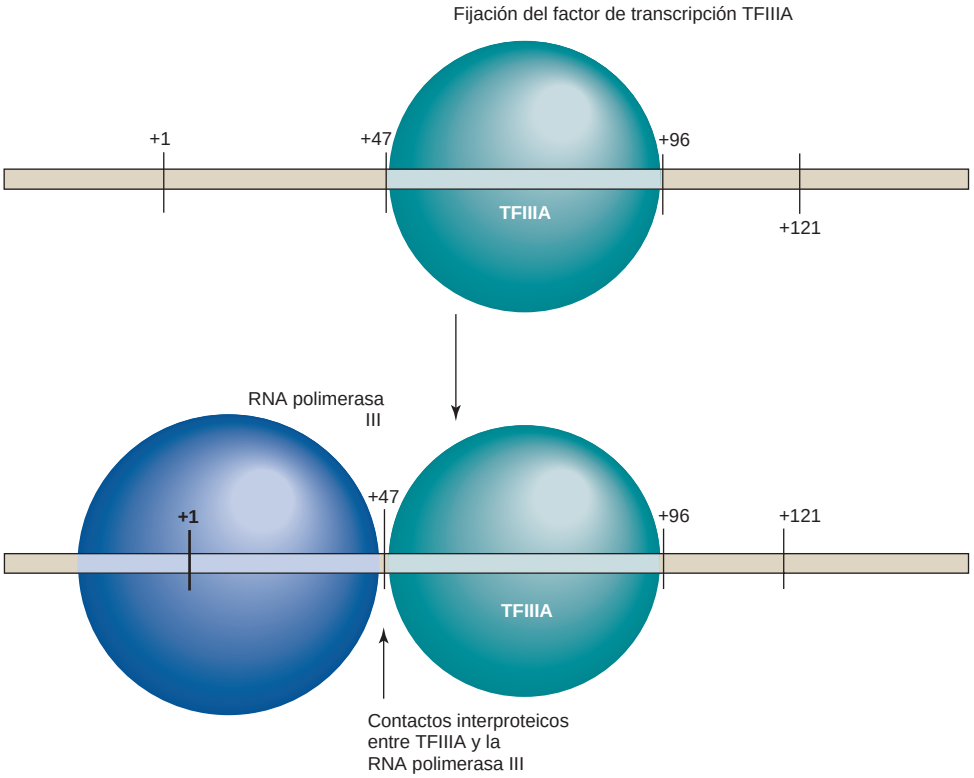


FIGURA 5.8
Factor de transcripción para un gen eucariótico de la clase III.
El factor de transcripción TFIIIA se une a una secuencia localizada en el interior del gen del rRNA 5S de *Xenopus*. La RNA polimerasa III se une a continuación al factor e inicia la transcripción de la secuencia del 5S. No se precisa ninguna otra secuencia específica adicional que la de unión del factor.

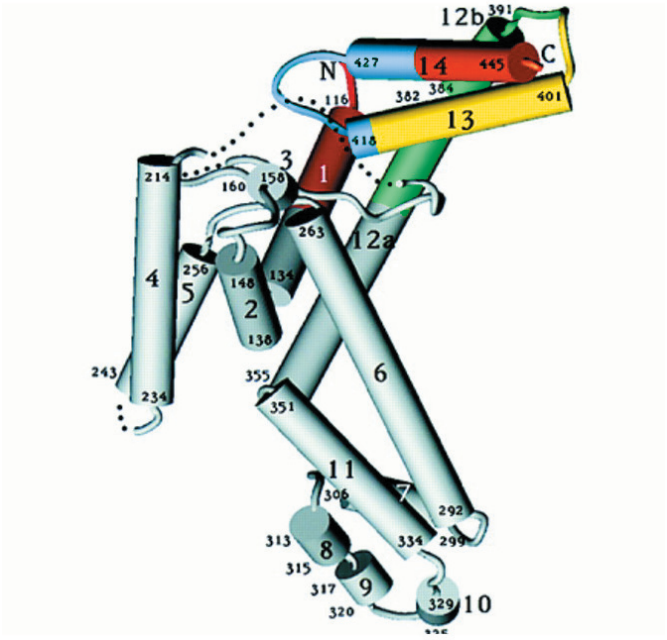
5′, no posee ninguna secuencia específica, y puede ser sustituido por otras secuencias sin efectos sustanciales sobre la transcripción. En la Figura 5.8 se representa esta organización poco frecuente. En otros casos, por ejemplo en la transcripción del tRNA, la secuencia de unión al factor se localiza de forma más convencional en la región 5′ del gen, precediendo a la secuencia que va a ser transcrita.

Principios comunes en la acción de la RNA polimerasa

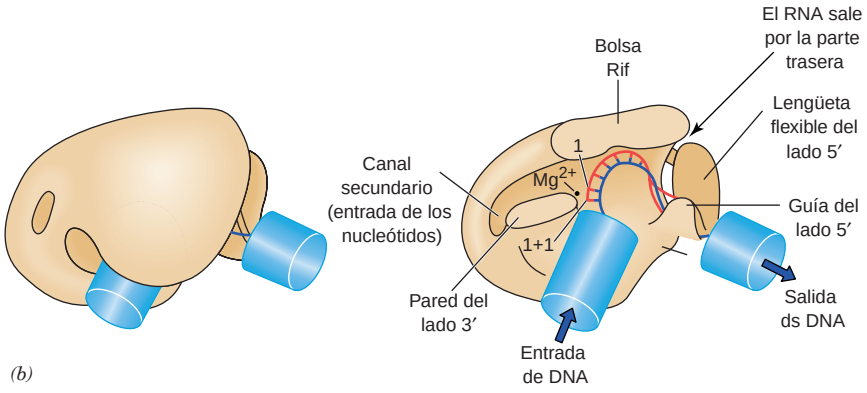
Nuestros conocimientos de las bases moleculares de la acción de la **RNA polimerasa** han aumentado recientemente gracias a la determinación de la estructura por cristalografía de rayos X de un factor σ, de la RNA polimerasa bacteriana núcleo y de una RNA polimerasa II eucariótica. A pesar de las diferencias de composición en subunidades, tamaño y mecanismo, estos enzimas parecen interaccionar con sus moldes y sustratos nucleotídicos de forma similar.

El factor σ es una proteína oblonga, formada por un haz de hélices α, empaquetadas en forma de "V" abierta (Figura 5.9a). Uno de los brazos de la "V" contiene residuos críticos para el reconocimiento del promotor y la unión de la polimerasa núcleo. Un lado de este brazo contiene una hélice α que se une a la secuencia "−10", mientras que la otra cara se une a la polimerasa núcleo a través de interacciones hidrofóbicas. El enzima núcleo bacteriano tiene forma de ratón de ordenador o de la pinza de un cangrejo (Figura 5.9b). El DNA entra por un extremo de la molécula, da un giro de 90º y sale de la polimerasa. La estructura en doble hélice del DNA se abre en la región de la curvatura. Los nucleótidos entran y el RNA sale por otros dos canales separados de la molécula. Una estructura flexible de la subunidad β actúa a modo de lengüeta para mantener el DNA en el canal.

La estructura tridimensional de la RNA polimerasa II eucariótica muestra un canal a través del cual pasa el molde de DNA, un poro para la entrada de los ribonucleósidos trifosfato y otro poro para la salida del producto. El molde de DNA también tiene que curvarse a medida que se abre para acomodar el híbrido formado



(a)



(b)

FIGURA 5.9
Estructuras de algunas partes importantes de la RNA polimerasa bacteriana.
(*a*) Diagrama esquemático de la subunidad σ bacteriana más abundante. Las hélices amarilla y verde (representadas como cilindros) entran en contacto con la estructura núcleo para formar el holoenzima, mientras que la región en azul reconoce la secuencia del promotor. (*b*) Diagrama del mecanismo de la RNA polimerasa núcleo durante la elongación. Izquierda: La estructura del enzima se parece a la concha de un bivalvo o a la pinza de un cangrejo. La "pinza" de la parte superior del enzima sujeta al DNA. Derecha: Corte del enzima para mostrar la curva cerrada descrita por el DNA en el lugar de formación del enlace fosfodiéster. *Parte (a) tomada de Malhotra, A., Severinova, E. y Darst, S.A.* Cell *87: 127, 1996; parte (b) de Zhang, G., Cambell, E.A., Minaklin, L. et al.* Cell *98: 811, 1999. Reproducido con permiso de los autores y de Elsevier Science.*

por la hebra molde y la cadena de RNA en crecimiento. Así pues, a pesar de su muy distinta composición en subunidades, todas las RNA polimerasas llevan a cabo los mismos procesos: hacen pasar el molde de DNA a través de un canal, guían los nucleótidos hasta el sitio activo a través de un poro del enzima y evacuan el producto de RNA a través de otro poro.

5.4 | MADURACIÓN DEL RNA

Las copias de RNA de las secuencias de DNA deben ser modificadas para dar una molécula funcional madura tanto en los procariotas como en los eucariotas. Las reacciones de **maduración del RNA** pueden incluir la eliminación de nucleótiodos, modificaciones de las bases, adición de nucleótidos y la escisión de las diferentes

secuencias de RNA por la acción de nucleasas específicas. Finalmente, en los eucariotas el RNA debe ser exportado fuera del núcleo.

El RNA de transferencia se modifica por corte, adición y modificación de bases

Corte

El transcrito primario de un gen de tRNA contiene secuencias nucleotídicas adicionales en ambos lados 5′ y 3′ de la secuencia del tRNA. En algunos casos, estos transcritos primarios también contienen **intrones** en la región del anticodón del tRNA. Las reacciones de maduración se dan en un orden temporal definido, aunque no necesariamente rígido. En primer lugar, el transcrito primario es recortado de forma relativamente inespecífica para dar lugar a una molécula precursora con extensiones 5′ y 3′ más cortas. A continuación, la ribonucleasa P, un ribozima (véase la p. 86), elimina la extensión en 5′ mediante un corte endonucleolítico. Tras la eliminación exonucleolítica del extremo 3′, se realiza la síntesis del extremo CCA. La síntesis de los nucleótidos modificados se da en cualquier momento en relación con el recorte nucleolítico. Los intrones se eliminan en un proceso dirigido por la estructura secundaria del precursor (véase la Figura 5.10), y se lleva a cabo por un sistema enzimático soluble de dos componentes: un enzima elimina el intrón, y otro empalma la cadena nucleotídica.

Adiciones

Cada tRNA funcional tiene en su extremo 3′ la secuencia CCA. Esta secuencia es esencial para que el tRNA acepte aminoácidos. En muchos casos, esta secuencia se añade de forma gradual por el enzima **tRNA nucleotidiltransferasa**. La nucleotidiltransferasa usa ATP y CTP como sustratos, y los incorpora siempre en el tRNA en una proporción 2C/1A. Los extremos CCA se encuentran tanto en los tRNA citoplasmáticos como en los mitocondriales.

Nucleósidos modificados

Los nucleótidos del RNA de transferencia son los más extensamente modificados de entre todos los ácidos nucleicos. En el tRNA se han encontrado más de 60 modificaciones diferentes en las bases y en la ribosa, para las que son necesarias más de 100 reacciones enzimáticas diferentes. Muchas de ellas son metilaciones simples de un solo paso, pero otras son procesos de síntesis de pasos múltiples. Dos derivados, la **pseudouridina** y la **quenosina** (7–4, 5-*cis*-dihidroxi-1-ciclopenten-3-ilamino metil-7-desazaguanosina) requieren para su síntesis la rotura del enlace β-glucosídico del nucleótido alterado. Un enzima o un grupo de enzimas produce una única modificación específica de sitio en más de una especie de tRNA. Enzimas o grupos de enzimas diferentes pueden producir la misma modificación en más de un punto del tRNA. Dicho de otro modo, la mayor parte de los enzimas de modificación son específicos de sitio o de secuencia de nucleótidos, pero no son específicos de tRNA. La mayoría de las modificaciones se completan antes de que los precursores del tRNA hayan sido cortados hasta el tamaño del tRNA maduro.

La maduración del RNA ribosómico libera los diferentes RNA a partir de un precursor más largo

El producto inicial de la transcripción del rRNA es un largo RNA denominado RNA 45S, que contiene las secuencias de los RNA 28S, 5,8S y 18S. La maduración del RNA 45S tiene lugar en el nucleolo. De igual forma que en la modificación de los precursores del mRNA (véase más adelante), la maduración del los precursores del rRNA corre a cargo de grandes complejos multiméricos de ribonucleoproteína. Para la maduración se requieren al menos tres tipos de RNA. Los tres actúan como pequeños complejos ribonucleoproteicos nucleolares. La maduración de los rRNA tiene lugar en orden secuencial (Figura 5.11).

La maduración del pre-rRNA de los procariotas supone también el corte de precursores de elevada masa molecular para dar moléculas más pequeñas. Algunas bases están modificadas por metilación de los nitrógenos del anillo de las bases, más que por modificación de la ribosa, y por formación de pseudouridina. Estas reacciones son llevadas a cabo por **pequeñas partículas ribonucleoproteicas nucleolares (snoRNP)**. Cada snoRNP contiene un RNA guía que se aparea con una corta secuencia del transcrito de rRNA y de esta forma especifica el lugar de la modificación.

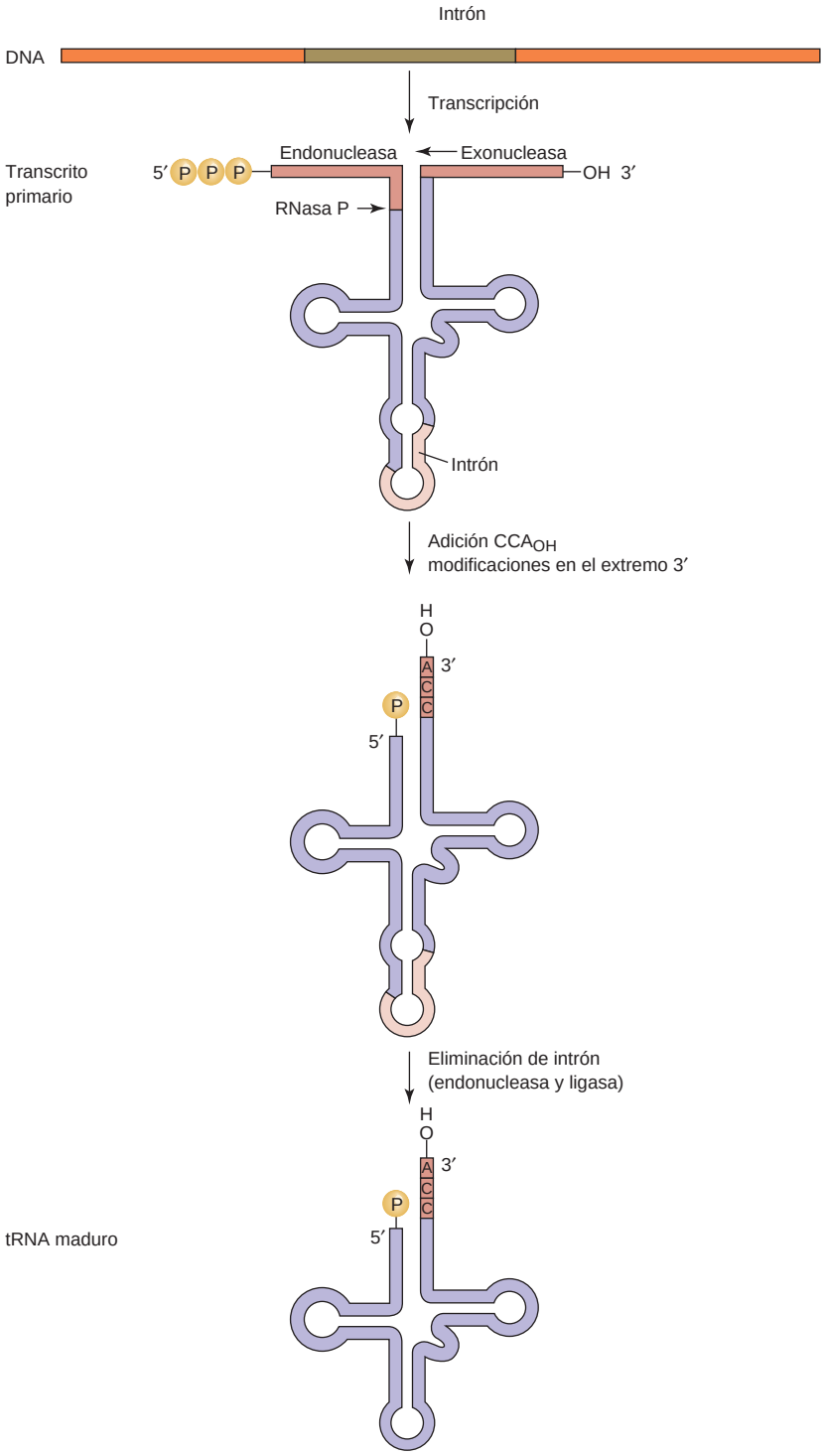


FIGURA 5.10
Esquema de la maduración de un tRNA eucariótico. El transcrito primario es cortado por la RNasa P y una 3′ exonucleasa y, en caso necesario, la secuencia CCA terminal es sintetizada por la tRNA nucleotidil transferasa antes de la eliminación del intrón.

La maduración del RNA mensajero requiere el mantenimiento de la secuencia codificadora

Muchos mRNA eucarióticos tienen rasgos estructurales distintivos adquiridos en el núcleo mediante sistemas enzimáticos distintos de la RNA polimerasa. Entre ellos se encuentran la cola de poli(A) 3′ terminal, nucleótidos internos metilados y el casquete en el extremo 5′. Los mRNA citoplasmáticos son más cortos que sus transcritos primarios, que pueden contener secuencias terminales e internas adicionales. Las secuencias no codificadoras presentes en el pre-mRNA, pero que no se encuentran en los mRNA maduros, se denominan **secuencias interpuestas** o **intrones**. Las se-

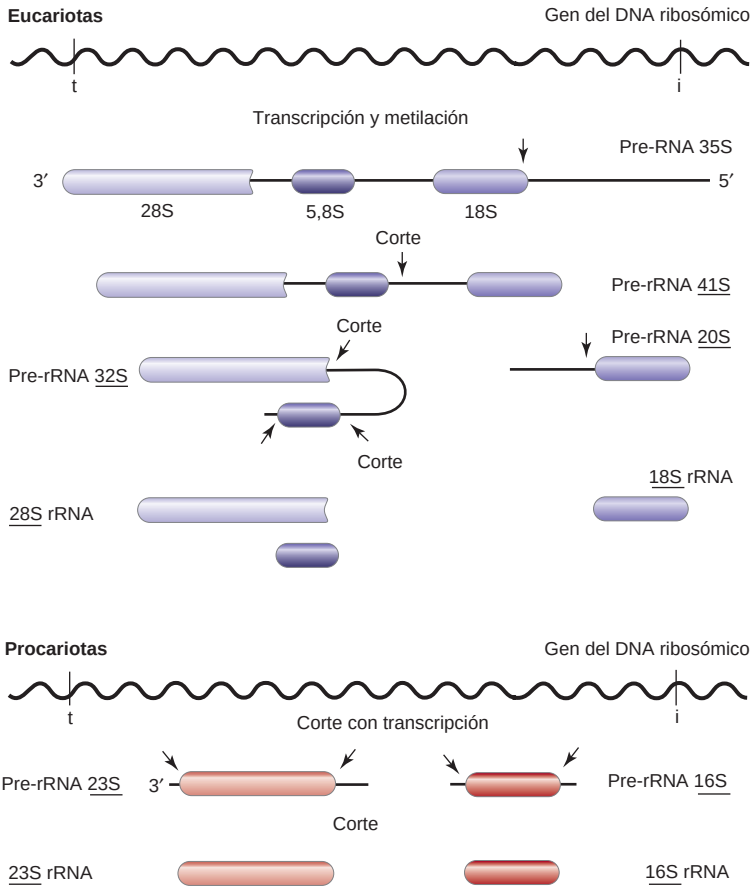


FIGURA 5.11
Esquemas de la transcripción y maduración del rRNA.
Adaptado de Perry, R. Ann. Rev. Biochem. *45:611, 1976. Copyright © 1976 by Annual Reviews, Inc.*

cuencias expresadas o retenidas se denominan **exones**. En la Figura 5.12 se representa el patrón general de maduración de los mRNA. Los mRNA parcialmente procesados representan una parte importante del RNA heterogéneo nuclear (HnRNA).

La maduración de los pre-mRNA ecuarióticos conlleva una serie de reacciones moleculares, que deben ser realizadas con gran exactitud. Este principio se pone en evidencia en la eliminación de los intrones de un transcrito de mRNA. Un nucleótido de más en una secuencia de mRNA codificadora daría lugar a un desplazamiento del marco de lectura del mensaje, que casi con total seguridad generaría una proteína no funcional. De hecho, las mutaciones que interfieren con la eliminación de los intrones son una de las causas principales de las enfermedades genéticas humanas, por ejemplo, la ***β*-talasemia** (véase la Apli. Clín. 5.4). La tarea resulta aún más ardua para la célula pues algunos genes humanos de gran importancia contienen más de un 90% de secuencias intrónicas. Las complejas reacciones que eliminan los intrones son llevadas a cabo por sistemas multienzimáticos que actúan en el núcleo. Una vez completadas estas reacciones, el mRNA es exportado al citoplasma, donde interacciona con los ribosomas para iniciar la traducción. La maduración del transcrito tiene lugar mientras éste todavía está siendo elongado por la RNA polimerasa –modalidad denominada cotranscripción.

La RNA polimerasa II recluta enzimas de modificación durante la transcripción en los eucariotas

La subunidad grande de la RNA polimerasa II contiene un dominio C-terminal que acopla la transcripción y la maduración. Cuando la RNA polimerasa II se encuentra en el modo de iniciación, el C-terminal no se modifica. Cuando el transcrito ha alcanzado unos 25 nucleótidos de longitud, el C-terminal se fosforila de forma extensiva. La fosforilación del dominio C-terminal recluta sucesivamente el enzima

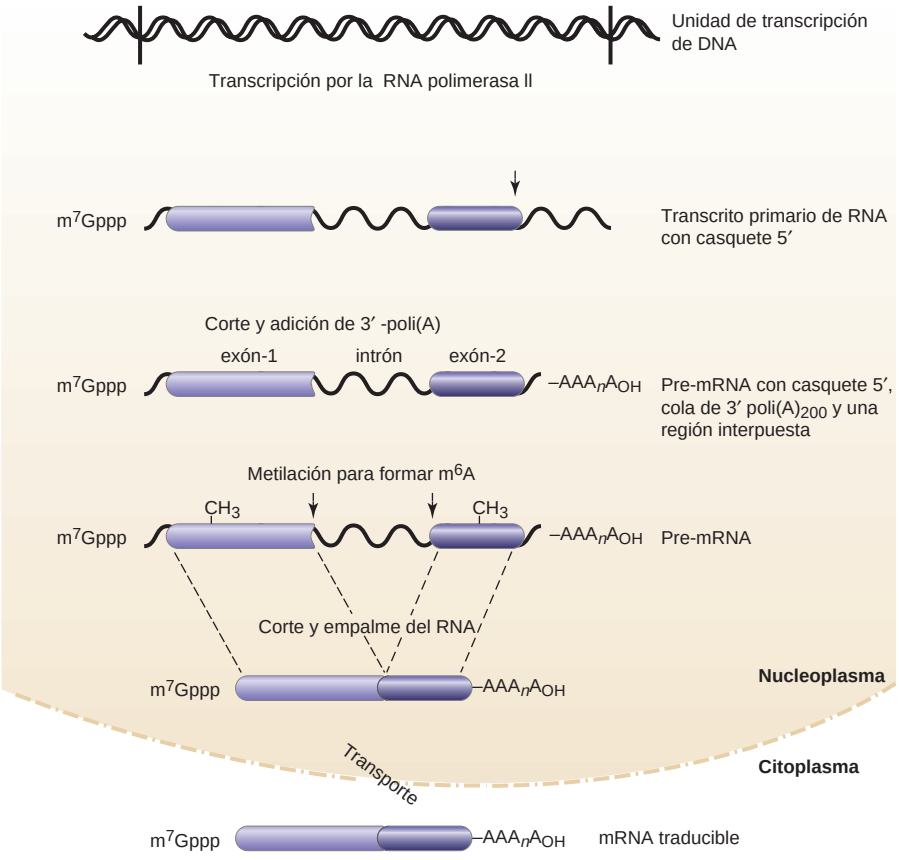
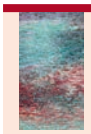


FIGURA 5.12
Esquema de la maduración del mRNA. Los puntos de iniciación y terminación de la transcripción se indican en el DNA. Las flechas indican los puntos de corte. No se muestran las muchas proteínas asociadas con el RNA, ni tampoco las configuraciones terciarias.



APLICACIÓN CLÍNICA 5.4
La talasemia se debe a defectos en la síntesis del RNA mensajero

Las talasemias son defectos genéticos de la síntesis coordinada de las cadenas peptídicas de α- y β-globina; un déficit de cadenas β se denomina β-talasemia, mientras que un déficit de cadenas α se denomina α-talasemia. Los pacientes afectados por una de estas dolencias presentan signos de anemia a los 6 meses de vida aproximadamente, momento en que cesa la síntesis de HbF y la síntesis de HbA empieza a ser predominante. Según la gravedad de los síntomas las talasemias se clasifican en mayor, cuando existe una deficiencia importante en la síntesis de globina, y menor, cuando el desequilibrio presenta una menor gravedad. En algunos casos se observa una forma intermedia. La terapia para la talasemia mayor implica transfusiones frecuentes, que conllevan cierto riesgo de complicaciones por exceso de hierro. Si la terapia por quelación resulta infructuosa, la deposición de hierro en los tejidos periféricos, efecto denominado hemosiderosis, puede causar la muerte antes de la edad adulta. La forma más corriente de la enfermedad es la talasemia menor, que provoca una anemia ligera. La enfermedad es común en individuos de las zonas mediterráneas, de Arabia y con ascendientes en el este de Asia. Al igual que en el caso de la anemia falciforme (HbS) y en la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la anormalidad de los eritrocitos de los portadores proporciona cierta protección frente a la malaria. Los mapas de las regiones donde son frecuentes estas enfermedades en la población nativa, se superponen con las zonas donde la malaria es endémica.

La talasemia α es generalmente debida a una deleción genética, que puede ocurrir porque los genes de α-globina están duplicados; el entrecruzamiento desigual entre alelos α adyacentes puede causar la pérdida de uno o más loci. Por el contrario, la β-talasemia puede ser resultado de una gran variedad de mutaciones. Algunos de los fenómenos conocidos incluyen cambios en el marco de lectura de la secuencia codificante de la globina β, así como mutaciones que conducen a una terminación prematura en la síntesis peptídica. Muchas β-talasemias resultan de mutaciones que afectan a la biosíntesis del mRNA de la β-globina. Se conocen ciertos defectos genéticos que afectan al promotor del gen, y que dan lugar a una transcripción deficiente. Otras mutaciones dan lugar a la maduración aberrante del transcrito naciente, tanto en la eliminación de los dos intrones como en la poliadenilación del mRNA precursor. En el texto se tratan algunos ejemplos en los que el defecto a nivel molecular ilustra un principio general de la síntesis del mRNA.

Orkin, S. H. Disorders of hemoglobin synthesis: the thalassemias. In: G. Stamatoyannopoulis, A. W. Nienhuis, P. Leder, y P. W. Majerus (Eds.), *The Molecular Basis of Blood Diseases*. Philadelphia: Saunders, 1987; y Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Higgs, D. R. y Wood, W. G. The hemoglobinopathies. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

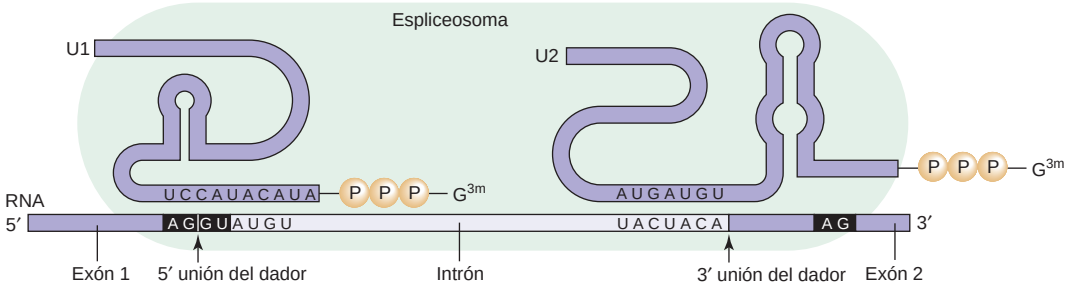


FIGURA 5.13
Mecanismo de reconocimiento de la uniones de corte y empalme.
El reconocimiento de la unión de corte y empalme en posición 5′ implica el apareamiento de bases entre la unión intrón–exón y el RNA snRNP U1. Este apareamiento convierte al intrón en diana del mecanismo de eliminación.
Adaptado de Sharp, P. A. JAMA 260:3035, 1988.

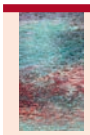
responsable de la síntesis del casquete y los complejos de corte y empalme y de poliadenilación. Por lo tanto, todas estas modificaciones tienen lugar durante la transcripción.

Síntesis del casquete

A medida que el complejo de transcripción se desplaza a lo largo del DNA, el complejo enzimático encargado de la síntesis del **casquete** modifica el extremo 5′ del mRNA naciente. La síntesis del casquete consiste en la síntesis de un enlace trifosfato de 5′ a 5′ que añade un residuo guanililo al transcrito. Esta estructura se modifica posteriormente por metilación.

Eliminación de intrones de precursores del mRNA

A medida que el pre-mRNA va saliendo del complejo de la RNA polimerasa, rápidamente se le unen **ribonucleoproteínas nucleares pequeñas**, **snRNPs** (*snurps*), que llevan a cabo las dos etapas del corte y empalme: (1) el corte del intrón en el sitio dador en 5′ y (2) el empalme de las secuencias de los exones del lado 5′ y del lado 3′. Todos los **intrones** comienzan con GU y acaban con AG, estas secuencias se denominan **uniones intrón–exón dadora** y **aceptora**, respectivamente. Sin embargo, no todas las secuencias GU o AG son cortadas y eliminadas del RNA. ¿Cómo reconoce la célula las secuencias GU pertenecientes a un intrón (y que por lo tanto deben ser eliminadas) y las que deben permanecer en el mRNA maduro? La discriminación se lleva a cabo por el apareamiento entre el **RNA U1** y la secuencia del mRNA precursor que rodea a la secuencia dadora GU (Figura 5.13) (véase Apli. Clín. 5.5). Otra snRNP, que contiene el **RNA U2**, reconoce secuencias importantes en el extremo aceptor 3′ del intrón. Hay otras especies de snRNP, entre ellas U5 y U6, que se unen al RNA precursor, formando un gran complejo denominado **espliceosoma** (por analogía con el complejo ribonucleoproteico implicado en la síntesis de proteínas, el ri-



APLICACIÓN CLÍNICA 5.5

La autoinmunidad en las enfermedades del tejido conjuntivo

Los anticuerpos humorales del suero de pacientes afectados por diversas enfermedades del tejido conjuntivo reconocen una gran variedad de complejos ribonucleoproteicos. Los pacientes afectados por lupus eritematoso sistémico presentan una actividad sérica inmune denominada Sm, mientras que los afectados por la enfermedad mixta del tejido conjuntivo poseen un anticuerpo denominado RNP. Cada anticuerpo reconoce un sitio distinto en el mismo complejo RNA–proteína, RNP U1, relacionado con la maduración del mRNA en las células de mamíferos. El complejo RNP–U1 contiene RNA U1, una secuencia de 165 nucleótidos altamente conservada en eucariotas, que presenta en su extremo 5′ una secuencia complementaria a las uniones intrón–exón. La adición de este anticuerpo a ensayos de corte y empalme *in vitro* inhibe dicho proceso, presumiblemente mediante la eliminación del RNP–U1 de la reacción. El suero de pacientes afectados por otras enfermedades del tejido conjuntivo reconoce diferentes antígenos nucleares, proteínas nucleolares y/o los centrómeros de los cromosomas. Se ha observado que el suero de pacientes con miositis es capaz de reconocer antígenos citoplasmáticos tales como las aminoacil-tRNA sintetasas. A pesar de que se ha observado que los anticuerpos humorales pueden penetrar en las células a través de los receptores Fc, no existen pruebas de que este hecho esté relacionado con los mecanismos de la enfermedad autoinmune.

bosoma). El espliceosoma emplea la energía del ATP para llevar a cabo la eliminación del intrón. En primer lugar, se rompe el enlace fosfodiéster entre el exón y la secuencia dadora GU, dejando un grupo 3′-OH libre en el extremo del primer exón y un fosfato en 5′ en la guanosina dadora del intrón. Este pG es utilizado seguidamente para formar un enlace poco usual con el grupo 2′-OH de una adenosina dentro del intrón, formando así una estructura ramificada o estructura de RNA en lazo, tal como se muestra en la Figura 5.14. Tras la formación del lazo tienen lugar el segundo paso de la reacción de empalme. El enlace fosfodiéster inmediatmente después de AG es cortado y a continuación se ligan las secuencias de los dos exones.

Poliadenilación

La RNA polimerasa sigue transcribiendo el gen hasta alcanzar la **secuencia de la señal de poliadenilación** (Figura 5.15). Esta señal, con secuencia consenso AAUAAA, aparece en el mRNA maduro pero no forma parte de la región codificadora. Más bien funciona como una señal para el corte en la cadena naciente del mRNA precursor, que se efectúa unos 20 nucleótidos más abajo. La secuencia poli(A) es añadida a continuación por una polimerasa al extremo 3′ resultante de dicho corte. El dominio C-terminal de la RNA polimerasa II recluta el complejo de corte y **poliadenilación** sobre el transcrito. Al mismo tiempo, la RNA polimerasa termina la transcripción, aunque los detalles del mecanismo no se conocen en su totalidad. El producto final de la maduración es un mRNA codificador funcional sin intrones y listo para dirigir la síntesis de proteína.

Las mutaciones en las señales de corte y empalme son causa de enfermedades en humanos

El proceso de corte y empalme del RNA mensajero es un proceso complejo que depende de muchos fenómenos moleculares. Si las etapas no se realizan con la precisión debida, no se produce un mRNA funcional. Este principio se manifiesta en las

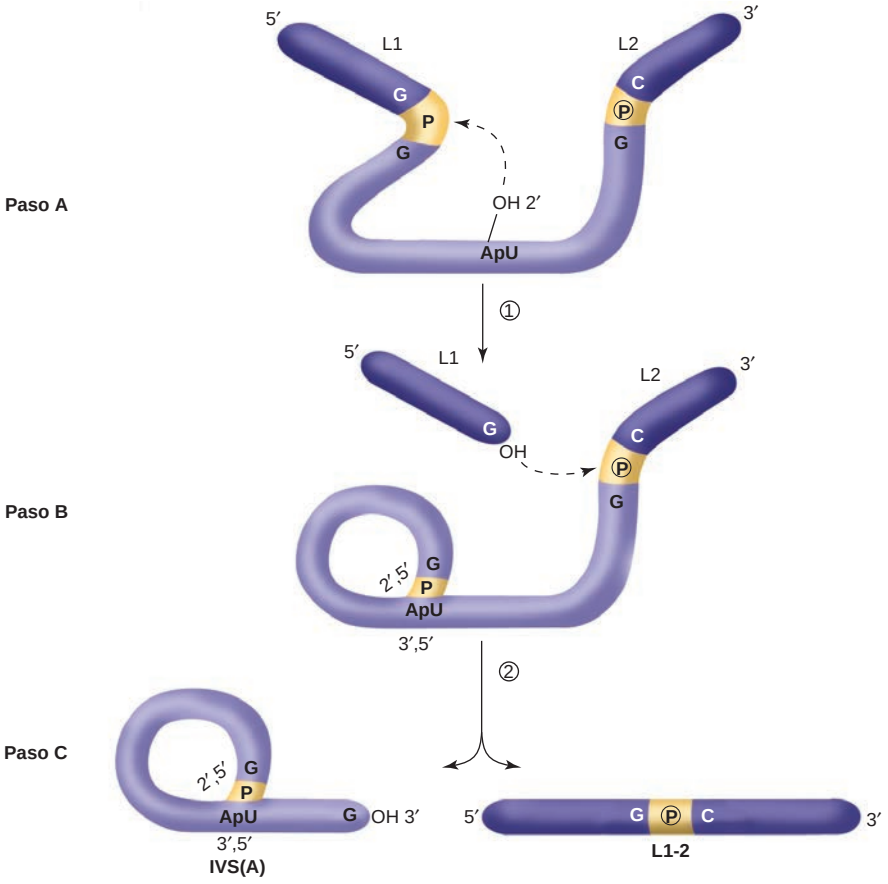


FIGURA 5.14
Esquema propuesto para el proceso de corte y empalme del mRNA que incluye la estructura en lazo.
Se representa un RNA mensajero con dos exones (en azul oscuro) y un intrón interpuesto (en azul claro). Un grupo 2′-OH de la secuencia del intrón reacciona con el fosfato 5' del nucleótido terminal en 5′ del intrón, formando un enlace 2′–5′ y la estructura en lazo. Simultáneamente, se rompe el enlace fosfodiéster exón 1–intrón, generándose un nuevo 3′-OH terminal en este exón, que puede reaccionar con el fosfato 5′ del exón 2, que desplaza al intrón y produce el mRNA maduro. El intrón con el lazo se libera y es digerido a continuación por nucleasas celulares.

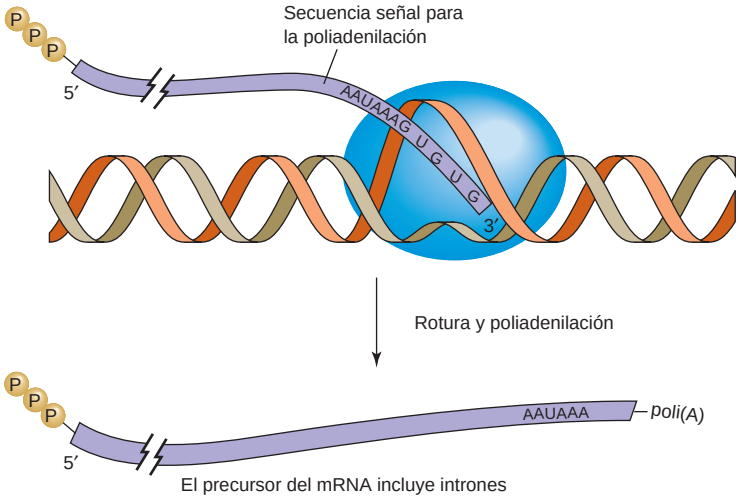


FIGURA 5.15
Corte y poliadenilación de los precursores de mRNA eucarióticos.
Los extremos 3′ de las especies eucarióticas de mRNA son producto de reacciones de modificación. La secuencia AAUAAA en el mRNA especifica el corte en el mRNA precursor. El extremo 3′-OH libre del mRNA es el cebador para la síntesis del poli(A). *Adaptado de Proudfoot, N. J.* Trends Biochem. Sci. *14:105, 1989.*

talasemias humanas, en las cuales se ve afectada la síntesis equilibrada de las cadenas α- y β- de la globina (Apli. Clín. 5.4). Algunas de las mutaciones que causan la β-talasemia interfieren con el corte y empalme de los precursores de mRNA de la β-globina. Sabemos, por ejemplo, que las secuencias de todos los intrones empiezan con el dinucleótido GU. La mutación de la G de esta secuencia a A implica que la maquinaria de corte y empalme no reconocerá este dinucleótido como el sitio dador del intrón, y el corte y empalme pasará por alto la unión exón–intrón correcta. Como resultado, pueden aparecer secuencias adicionales en el mRNA de la β-globina, que normalmente habrían sido eliminadas, o, alternativamente, pueden eliminarse secuencias del mRNA producido (Figura 5.16). En cualquier caso, la β-globina funcional será sintetizada en menor cantidad, y aparecerá la anemia característica de la enfermedad.

El corte y empalme alternativos del pre-mRNA puede dar lugar a múltiples proteínas a partir de una única secuencia de DNA codificadora

La existencia de secuencias intrónicas es paradójica. Los intrones deben ser eliminados con precisión para que el mRNA codifique la proteína adecuada. Como hemos visto anteriormente, el cambio de una única base puede interferir drásticamente en el corte y empalme y causar graves enfermedades. Además, la presencia de intrones en un gen implica que su secuencia completa es mucho mayor que la requerida para codificar su producto proteico. Un gen grande sufre un mayor número de mutaciones que un gen pequeño. De hecho, algunas enfermedades genéticas comunes en el ser humano, como la **distrofia muscular de Duchenne**, se dan en genes formados por millones de pares de bases. ¿Por qué la naturaleza no ha eliminado completamente los intrones durante la evolución de los eucariotas? No existen respuestas claras para este tipo de preguntas, pero en algunos casos la presencia de intrones tiene efectos beneficiosos.

Las **tropomiosinas** son proteínas esenciales del aparato contráctil en los tres tipos de músculo (véase pág. 1023), y cada uno contiene un tipo específico de tropomiosina. Esta diversidad se produce a partir de un solo gen que se transcribe en un transcrito primario. El transcrito es modificado como se muestra en la Figura 5.17. Todas las células que contienen tropomiosina producen el mismo transcrito primario, pero cada tipo celular lo procesa de forma característica. Las especies de mRNA resultantes se traducen para dar la tropomiosina característica de cada tipo celular. Hay unos 40 ejemplos bien documentados de corte y empalme específico de tejido. Por lo tanto, la existencia de intrones proporciona al organismo un método adicional para la generación de diversidad proteica. Tal vez no es sorprendente que la RNA polimerasa II y/o los factores de transcripción con especificidad de gen estén implicados en la elección del sitio de corte y empalme.

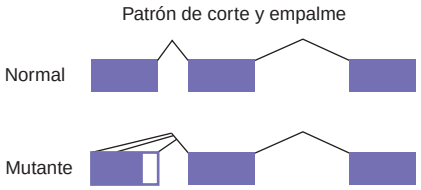


FIGURA 5.16
Cambio en los nucleótidos de la unión intrón–exón del gen de la β-globina humana que causa un corte y empalme aberrante y β-talasemia.
La figura muestra el patrón de corte y empalme de un transcrito mutante que contiene un cambio de G-U a A-U en los dos primeros nucleótidos del primer intrón. La pérdida de la secuencia invariable hace que la unión de corte y empalme correcta no pueda ser utilizada. Por lo tanto, secuencias del transcrio que se aparean peor con el snRNA U1 que la secuencia no mutada son utilizadas como secuencias dadoras. Las líneas diagonales indican las porciones empalmadas en los transcritos mutantes. Obsérvese que algunas de las moléculas precursoras de los mRNA mutantes son cortadas y empalmadas de forma que en el producto maduro aparecen porciones del primer intrón (indicadas por recuadros blancos). En otros casos, la secuencia dadora se encuentra dentro del primer exón, siendo eliminadas ciertas regiones del primer exón. En ningún caso se produce el mRNA de la globina salvaje.
Adaptado de Orkin, S. H. In: G. Stamatoyannopoulis, et al. (Eds.), The Molecular Basis of Blood Diseases. *Philadelphia: Saunders, 1987.*

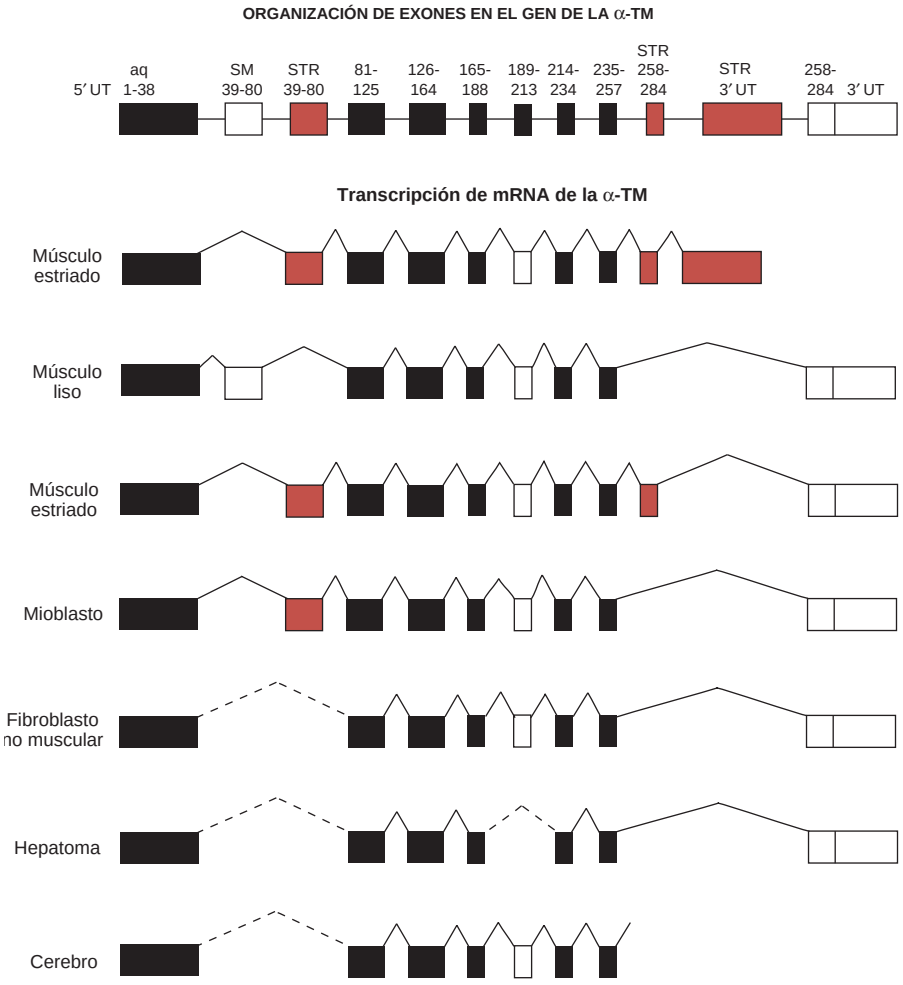


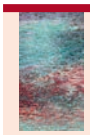
FIGURA 5.17
El corte y empalme alternativo de los transcritos del gen de la tropomiosina da lugar a una familia de tropomiosinas específicas de tejido.
Adaptado de Breitbart, R. E., Andreadis, A. y Nadal-Guinard, B. Annu. Rev. Biochem. *56:467. 1986.*

5.5 EXPORTACIÓN DEL RNA DEL NÚCLEO

Los RNA mensajeros, de transferencia y ribosómicos actúan en el citoplasma. La salida del núcleo se efectúa a través de los **poros nucleares**. El complejo de los poros de membrana tiene forma cilíndrica y abarca el espesor de la membrana. Dentro del cilindro hay dos anillos apilados y un "tapón" central. Los iones pequeños pueden pasar a través del poro entre el tapón y los anillos, pero el RNA es demasiado grande para pasar a través de este espacio. La exportación del RNA se produce a través de un canal del tapón, para lo que el RNA debe unirse a proteínas para formar partículas ribonucleoproteicas. El paso de los RNA ribosómicos se produce una vez han entrado a formar parte de los ribosomas en el nucleolo. Los RNA de transferencia pueden estar unidos a las aminoacil-tRNA sintetasas, pues pueden ser aminoacilados en el núcleo antes de la exportación. Los RNA mensajeros se exportan en forma de complejos que continen una proteína de unión al casquete en el extremo 5′ y proteínas de unión al RNA en el resto de la secuencia. El proceso requiere energía metabólica en forma de GTP, secuencias específicas en la proteína y una GTPasa.

5.6 REPARACIÓN DEL DNA ACOPLADA A LA TRANSCRIPCIÓN

Una lesión química en el DNA afecta a la expresión génica sólo si la secuencia alterada es transcrita. Las secuencias que no son expresadas no darán lugar a una mutación observable. Sería, pues, razonable que la reparación del DNA estuviera circunscrita a las secuencias que están siendo activamente transcritas. El acoplamiento de la transcripción y la reparación se produce porque las lesiones del DNA (tales como los **dímeros en ciclobutano**, véase el Capítulo 4) sobre la hebra molde cau-



APLICACIÓN CLÍNICA 5.6

Síndrome de Cockayne: Transcripción acoplada a la reparación del DNA

El síndrome de Cockayne (CS) es una dolencia autosómica recesiva compleja causada por una mutación en uno de dos genes. Los pacientes de CS presentan desórdenes neurológicos y en el desarrollo, alteraciones en el esqueleto y en la retina y dismorfia facial de "cara de pájaro". La muerte se produce habitualmente hacia los 20 años y está provocada por la degeneración neural. La mayor parte de pacientes de CS también son fotosensibles y predispuestos al cáncer de piel.

La fotosensibilidad indica la presencia de un defecto en la reparación del DNA. Por ejemplo, el xeroderma pigmentoso (XP) es el resultado de mutaciones en varios de los componentes de las rutas de reparación del DNA. El CS es también una deficiencia de la reparación del DNA. Sorprendentemente, uno de los dos genes responsables del síndrome es una subunidad de la DNA polimerasa II. La proteína codificada por el gen B del síndrome de Cockayne aumenta la velocidad de elongación por la RNA polimerasa II.

¿Cómo puede una deficiencia de la RNA polimerasa causar un problema de reparación? La respuesta es que los pacientes presentan deficiencias en la reparación del DNA acoplada a la transcripción. La reparación acoplada a la transcripción tiene lugar cuando la RNA polimerasa se detiene al encontrar una base alterada (p.e., un fotodímero de timina). La transcripción se detiene, el transcrito parcial se degrada y la hebra molde del DNA se repara. Parece ser que la potenciación de la transcripción por la proteína CSB también estimula la reparación acoplada a la transcripción.

Si eso fuese todo, el síndrome de Cockayne sería una variante del xeroderma pigmentoso; sin embargo, los pacientes de XP son normales desde el punto de vista neurológico y del desarrollo, pero son fotosensibles. ¿Qué provoca los otros síntomas del CS? Es probable que estos otros síntomas sean debidos a una deficiencia primaria de la elongación de la transcripción, causada por el factor de elongación CSB mutacionalmente alterado. Esta idea amplía nuestra comprensión de la relación entre mutación y enfermedad. Normalmente, las enfermedades genéticas están causadas por una mutación en un proceso bioquímico que se encuentra fuera de las rutas centrales de la información de la célula. Es razonable que sea así, porque la inhibición general de la síntesis de DNA, RNA o proteínas en una fase inicial del desarrollo sería letal. Los diversos defectos presentes en el CS deben ser causados por mutaciones que afecten la transcripción de unos genes más que la de otros.

Citterio, E., Vermeulen, W. y Hoeijmakers, J. H. J. Transcriptional healing. *Cell* 101:447, 2000; Selby, C. P y Sancar, A. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:11205, 1997; y van Gool, A. J., van der Horst, G. T. J., Citterio, E. y Hoeijmakers, J. H. J. Cockayne syndrome: defective repair of transcription? *EMBO J.* 16:4155, 1997.

san la detención de la RNA polimerasa II. Las RNA polimerasas detenidas constituyen la señal para que los sistemas de reparación por escisión eliminen las secuencias alteradas y resinteticen la secuencia correcta. Naturalmente, ello no es posible con la voluminosa RNA polimerasa unida al DNA, por lo tanto, el transcrito encallado es sacrificado. La deficiencia de la reparación acoplada a transcripción es la característica distintiva del **síndrome de Cockayne** (véase la Apli. Clín. 5.6).

5.7 NUCLEASAS Y RECAMBIO DEL RNA

Los diferentes papeles que el RNA y el DNA desempeñan en la expresión genética se manifiestan en sus destinos metabólicos. El almacén de información de una célula (DNA) debe preservarse, y ésta es la razón de la existencia de la multitud de sistemas de reparación del DNA y de edición existentes en el núcleo. A pesar de que segmentos individuales de nucleótidos del DNA puedan estar sometidos a recambio, la molécula, considerada como un todo, es metabólicamente inerte cuando no se encuentra en proceso de replicación. Por otro lado, se puede prescindir de moléculas de RNA individuales, pues éstas pueden ser reemplazadas por otras recién sintetizadas de la misma especificidad. No es, pues, sorprendente que no se hayan encontrado sistemas de reparación del RNA. En lugar de ello, los RNA defectuosos se eliminan en la célula por degradación hasta nucleótidos, los cuales son reutilizados para nuevas moléculas de RNA.

Este principio se manifiesta con mayor claridad en el caso de los RNA mensajeros clasificados como inestables. Sin embargo, incluso los RNA clasificados como estables sufren recambio; por ejemplo, la vida media de las especies de tRNA en el hígado es de unos 5 días. Puede considerarse que 30 horas es una vida media considerablemente larga para un mRNA eucariótico.

La eliminación de los RNA en el citoplasma corre a cargo de las **ribonucleasas** celulares. Inicialmente, los RNA mensajeros se degradan en el citoplasma. Las velocidades de degradación varían en diferentes mRNA, lo que sugiere la posibilidad de que exista control por degradación diferencial.

Se pueden citar dos ejemplos para ilustrar la influencia de la estabilidad del mRNA en el control de la expresión génica. La **tubulina** es el componente principal de los microtúbulos del citoesqueleto de muchos tipos celulares. Cuando la tubulina se encuentra en exceso, la proteína monomérica se une a su propio mRNA

y promueve su degradación, reduciendo así la síntesis de tubulina. Un segundo ejemplo lo proporcionan los **virus herpes simplex** (**HSV**), agente causante de herpes y de ciertas infecciones genitales. Un acontecimiento temprano en la infección por HSV es la desestabilización de todas las moléculas de mRNA celular, reduciendo así la competencia por los ribosomas libres; de esta forma, las proteínas víricas se sintetizan de manera más eficiente.

Las nucleasas son de tipos y especificidades diversas. La distinción más útil es entre **exonucleasas**, que degradan el RNA a partir del extremo 5′ o 3′, y **endonucleasas**, que cortan enlaces fosfodiéster del interior de la molécula. Los productos de la acción de las RNasas contienen fosfatos terminales 3′ o 5′, y tanto las endo como las exonucleasas pueden caracterizarse más a fondo por la posición (5′ o 3′) en la que se localiza el monofosfato creado por el corte.

La estructura del RNA afecta también a la acción de las nucleasas. La mayor parte de ribonucleasas son menos eficientes sobre estructuras de RNA altamente ordenadas. Por lo tanto, los tRNA son cortados preferentemente en las regiones no apareadas de la secuencia. Por otra parte, muchas RNasas implicadas en la maduración del RNA requieren una estructura tridimensional definida para que tenga lugar el reconocimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Bentley, D. Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:347, 1999.

Berk, A. J. Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:330, 1999.

Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. y Campos, I. To be or not to be in the nucleolus. *Nature Cell Biol.* 2:E107, 2000.

Caskey, C. T. Triple repeat mutations in human disease. *Science* 256:784, 1992.

Citterio, E., Vermeulen, W. y Hoeijmakers, J. H. J. Transcriptional healing. *Cell* 101:447, 2000.

Conaway, J. W. y Conaway, R. C. Transcription elongation and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 68:301, 1999.

Daneholt, B. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88:585, 1997.

Friend, S. A glimpse at the puppet behind the shadow play. *Science* 265:334, 1994.

Gesteland, R. F., Cech, T. y Atkins, J. F., (Eds.). *The RNA World,* 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

Izaurralde, E., Kann, M., Panté, N., Sodeik, B. y Hohn, T. Viruses, microorganisms and scientists meet at the nuclear pore. *EMBO J.* 18:289, 1999.

Koleske, A. J. y Young, R. A. The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem. Sci.* 20:113, 1995.

Larson, D. E., Zahradka, P. y Sells, B. H. Control points in eucaryotic ribosome biogenesis. *Biochem. Cell. Biol.* 69:5, 1991.

Lewin, B. *Genes VII.* New York: Oxford University Press, 2000.

Mooney, R. A. y Landick, R. RNA polymerase unveiled. *Cell* 98:687, 1999.

Orkin, S. H. Disorders of hemoglobin synthesis: the thalassemias. En: G. Stamatoyannopoulis, A. W. Nienhuis, P. Leder y P. W. Majerus (Eds.), *The Molecular Basis of Blood Diseases.* Philadelphia: Saunders, 1987, pp. 106–126.

Paule, M. R. y White, R. J. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28: 1283, 2000.

Proudfoot, N. Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem. Sci.* 25:290, 2000.

Ptashne, M. y Gann, A. Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386:569, 1997.

Rosenberg, M. y Court, D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 12:319, 1979.

Smith, C. W. J. y Valcárcel, J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25:381, 2000.

Weinberg, R. A. Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49:3713, 1989.

Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Higgs, D. R. y Wood, W. G. The hemoglobinopathies. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

Weinstein, L. B. y Steitz, J. A. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snRNP. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:378, 1999.

Wise, J. A. Guides to the heart of the spliceosome. *Science* 262:1978, 1993.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

Los siguientes términos se refieren a las preguntas 1–3.

A. HnRNA.
B. mRNA.
C. rRNA.
D. snRNA.
E. tRNA.

1. Tiene el mayor porcentaje de bases modificadas de entre todos los tipos de RNA.

2. RNA estable que representa el mayor porcentaje en peso del RNA celular.

3. Contiene un casquete de 7-metilguanosina trifosfato y un segmento de poliadenilato.

4. En la transcripción eucariótica:
   A. la RNA polimerasa no necesita molde.
   B. todos los tipos de RNA se sintetizan en el nucleolo.
   C. las secuencias consenso son los únicos elementos promotores conocidos.
   D. la formación del enlace fosfodiéster es favorable, en parte porque va acompañada de la hidrólisis del pirofosfato.
   E. la RNA polimerasa requiere un cebador.

5. La subunidad sigma (σ) de la RNA polimerasa procariótica:
   A. forma parte del enzima núcleo.
   B. se une al antibiótico rifampicina.

C. es inhibida por la α-amanitina.
D. debe estar presente para que se dé la transcripción.
E. reconoce específicamente los sitios del promotor.

6. La terminación de la transcripción procariótica:
   A. es un proceso al azar.
   B. necesita de la presencia de la subunidad rho del holoenzima.
   C. no necesita del factor rho si el extremo del gen contiene un palíndromo rico en G-C.
   D. es más eficiente si hay un fragmento rico en A-T en el extremo del gen.
   E. necesita una ATPasa además del factor rho.

7. La transcripción eucariótica:
   A. es independiente de la presencia de secuencias consenso más arriba del inicio de la transcripción.
   B. puede incluir la presencia de un promotor localizado dentro de la región transcrita, en lugar de más arriba.
   C. requiere la presencia de regiones promotoras separadas para cada uno de los tres RNA ribosómicos transcritos.
   D. requiere que todo el gen esté en la forma nucleosómica de la cromatina.
   E. está afectada por secuencias intensificadoras sólo si éstas se encuentran adyacentes al promotor.

8. Todas los enunciados siguientes respecto a un transcrito primario eucariótico son correctas EXCEPTO:
   A. es generalmente más largo que el RNA funcional.
   B. puede contener secuencias de nucleótidos que no estén presentes en el RNA funcional.
   C. no contiene bases modificadas.
   D. normalmente contiene información para más de una molécula de RNA.
   E. contiene una caja TATA.

9. La maduración del RNA de transferencia comprende los siguientes procesos a EXCEPCIÓN de:
   A. adición de una guanosina metilada en el extremo 5′.
   B. escisión de bases sobrantes, de ambos extremos 3′ y 5′.
   C. metilación de bases específica de secuencia.
   D. adición de la secuencia CCA por una nucleotidil transferasa.
   E. a veces, la eliminación de un intrón de la región del anticodón.

10. En el recambio celular del RNA:
    A. la reparación es más activa que la degradación.
    B. las regiones con mucho apareamiento de bases son más susceptibles al corte.
    C. las endonucleasas pueden cortar la molécula empezando tanto por el extremo 5′ como por el 3′.
    D. los productos son nucleótidos con un fosfato en el grupo hidroxilo 3′ o 5′.
    E. se cortan todos los tipos de RNA excepto el rRNA.

Preguntas 11 y 12: El síndrome del cromosoma X frágil es una de las formas de retraso mental más comunes. La mutación responsable consiste en el aumento de una repetición CGC de un gen determinado desde el número normal de unas 30 copias hasta 200-1000. La repetición se encuentra en la región 5′ transcrita pero no traducida del gen de una proteína denominada FMR1. Esta proteína puede que esté implicada en la traducción de un mRNA específico de cerebro durante el desarrollo cerebral. El efecto del elevado número de repeticiones CGC en el DNA es la metilación extensiva de la entera región promotora del gen *FMR1*.

11. La metilación de las bases del DNA normalmente:
    A. facilita la unión de los factores de transcripción al DNA.
    B. cambia la actividad solamente si ocurre en una región potenciadora.
    C. impide el despliegue de la cromatina.
    D. impide la transcripción del DNA.
    E. resulta finalmente en un aumento del producto de cualquier gen que se encuentre metilado.

12. La transcripción de los genes eucarióticos requiere no sólo la presencia de un promotor, sino también normalmente la presencia de intesificadores. Un intensificador:
    A. es una secuencia consenso del DNA localizada allí donde se une inicialmente la RNA polimerasa.
    B. puede situarse en lugares diferentes en genes diferentes.
    C. puede estar situado en cualquiera de las dos hebras del DNA.
    D. funciona uniéndose a la RNA polimerasa.
    E. estimula la transcripción tanto en procariotas como en eucariotas.

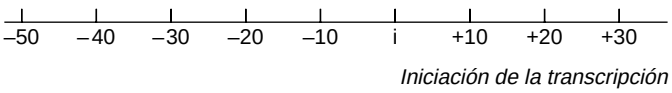
Preguntas 13 y 14: La síntesis de la hemoglobina normal adulta (HbA) requiere la síntesis coordinada de dos tipos de subunidades proteicas, α-globina y β-globina. La β-talasemia es una enfermedad genética causada por deficiencias en las cadenas de β-globina. Como consecuencia la sangre no es capaz de suministrar suficiente oxígeno. La β-talasemia está causada por una variedad de mutaciones.

13. Cualquiera de las siguientes situaciones podría causar el cese de la síntesis o la síntesis de una β-globina no funcional EXCEPTO:
    A. una mutación de cambio de fase de lectura que causara la terminación prematura de la síntesis proteica.
    B. Un mutación en la región promotora del gen de la β-globina.
    C. Una mutación en el extremo 3′ del gen de la β-globina que marca el sitio de poliadenilación.
    D. Una mutación dentro de un intrón que no afecte a una A.
    E. Todos los enunciados anteriores pueden dar este resultado.

14. Una mutación causante de β-talasemia se encuentra en un sitio de corte y empalme. ¿Cuáles de los siguientes enunciados acerca de la eliminación de los intrones (corte y empalme) son correctos?
    A. Las pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) son necesarias para eliminar los intrones.
    B. Las secuencias consenso en los extremos 5′ y 3′ de los intrones son idénticas.
    C. La eliminación de un intrón no requiere energía metabólica.
    D. El exón de un extremo de un intrón debe unirse siempre al exón del otro extremo del intrón.
    E. El nucleósido del primer extremo del intrón liberado en primer lugar forma un enlace con el grupo 3′-OH de uno de los nucleótidos del interior del intrón.

Problemas

15. Mediante una representación esquemática de un gen procariótico como la mostrada a continuación, indicar qué regiones estarían probablemente implicadas en los siguientes procesos:



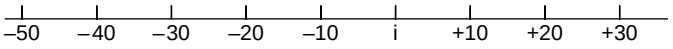
Iniciación de la transcripción

   a. La RNA polimerasa forma un “complejo abierto”.
   b. La RNA polimerasa se une primero al DNA.
   c. El enzima núcleo es suficiente para la catálisis.
   d. El factor sigma (σ) probablemente sería liberado.

16. (a) ¿Cómo podría determinarse experimentalmente si una preparación purificada de RNA polimerasa es de origen procariótico o eucariótico? (b) Una preparación purificada de RNA polimerasa es sensible a la inhibición por α-amanitina a una concentración de 10^{-8} M. ¿La síntesis de qué tipo o tipos de RNA es inhibida?

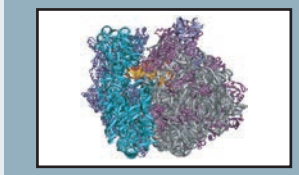
RESPUESTAS

1. **E** Parece ser que las bases modificadas son muy importantes para la estructura tridimensional del tRNA.
2. **C** La estabilidad del rRNA es necesaria para el funcionamiento repetido de los ribosomas.
3. **B** Durante la maduración se producen estas importantes adiciones que dan lugar a un mRNA eucariótico funcional.
4. **D** Este es un mecanismo importante para impulsar reacciones. A, B: La transcripción está dirigida por el código genético, y genera precursores del rRNA en el nucleolo y mRNA y precursores del tRNA en el nucleoplasma. C: La transcripción eucariótica puede tener regiones promotoras internas y también intensificadores. E: En esto difiere de la DNA polimerasa.
5. **E** A, D, E: La subunidad sigma es necesaria para la correcta iniciación y se disocia del enzima núcleo después de haberse formado los primeros enlaces. El enzima núcleo puede llevar a cabo la transcripción, pero no puede iniciarla correctamente. B y C: La rifampicina se une a la subunidad β, y la α-amanitina es un inhibidor de las polimerasas eucarióticas.
6. **C** La terminación independiente de rho implica la participación de la estructura secundaria, que está estabilizada por un elevado contenido en G-C. A, B, E: Existe un proceso dependiente de rho y un proceso independiente de rho. Rho es una proteína diferente de la RNA polimerasa, con actividad ATPasa. D: se requiere una región rica en G-C.
7. **B** La RNA polimerasa III emplea un promotor interno. A: En la actividad de la RNA polimerasa II participan las cajas TATA y CAAT. C: La RNA polimerasa I produce un transcrito, que más tarde es modificado para dar tres rRNA. D: Partes del promotor no forman parte de nucleosomas. E: Los intensificadores pueden estar alejados hasta 1000 pb.
8. **E** La caja TATA forma parte del promotor, que no se transcribe. A–D: Tanto la modificación de bases como el corte y empalme son procesos importantes en la maduración postranscripción que da lugar a moléculas funcionales.
9. **A** El casquete es una característica del mRNA. B: El transcrito primario es más largo que la molécula funcional. C: La misma modificación, catalizada por un (unos) enzima(s), se puede dar en más de un lugar. D: Esta es una modificación postranscripción
10. **D** La localizacion del —OH depende de qué lado del enlace fosfodiéster se corte. A: No hay procesos de reparación de RNA. B: La mayoría de los enzimas de degradación son menos eficientes sobre una estructura ordenada. C: Una endonucleasa corta un enlace fosfodiéster interno. E: Incluso el rRNA esta sujeto a recambio, aunque es más estable que las otras especies.
11. **D** La metilación-desmetilación del DNA es una forma de control, pues el DNA metilado es inactivo en la transcripción. A, E: Implicarían que la metilación activa al DNA. B: La alteración de la región intensificadora podría modificar la actividad, pero la alteración del promotor la modificaría necesariamente. C: El despliegue de la cromatina en esta región es necesario para la transcripción, pero la metilación del DNA no está implicada directamente en este proceso.
12. **B** B, C: Las secuencias potenciadoras ejercen sus efectos tanto si se encuentran al pricipio o al final del gen, pero deben encontrarse en la misma hebra que el gen transcrito. A: La RNA polimerasa se une primero al promotor. D: Parece que actúan uniendo proteínas, que a su vez unen a la RNA polimerasa.
13. **D** Una mutación en cualquiera de los extremos del intrón provocaría un error de corte y empalme, pero una mutación en medio de un intrón no debería hacerlo. La excepción sería la mutación de la adenosina en el punto de ramificación. A-C: Todos son correctos.
14. **A** Las snRNP son responsables tanto del corte del intrón en el extremo 5′ como del empalme de los exones. B: Las secuencias en los dos extremos de un intrón son diferentes —GU en el extremo 5′ y AG en el extremo 3′. C: El espliceosoma necesita ATP para eliminar el intrón. D: Los exones no consecutivos pueden empalmarse para dar múltiples proteínas a partir de un solo gen. E: El lazo se forma en un 2′-OH. Todos los 3′-OH ya están ocupados en la formación de la cadena.
15. (a) La caja de Pribnow con alto contenido en A-T facilita la apertura y se encuentra en la región −10. (b) La región −35 posee una secuencia consenso reconocida por la RNA polimerasa. (c) Así es de +20 en adelante (o incluso más cerca del inicio), cuando se encuentra en fase de elongación sólo se necesita el enzima núcleo. (d) El factor sigma se disocia justo o poco después del inicio de la transcripción, por lo tanto la región se encontraría entre *i* y +10.

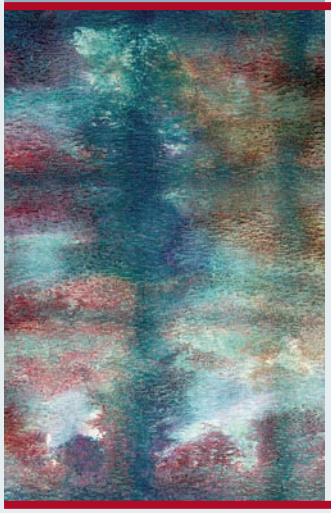


Iniciación de la transcripción

16. (a) Analice la preparación para la inhibición con α-amanitina a una concentración de unos 2 mg mL^{-1}. A esta concentración todas las formas de RNA polimerasa eucariótica son inhibidas, pero el enzima procariótico no lo es. Si la preparación no se inhibe con α-amanitina, confirmar que se inhibe con rifampicina. No será posible distinguir entre la RNA polimerasa eucariótica mitocondrial y el encima procariótico porque presentan la misma respuesta. (b) La RNA polimerasa II es sensible a la α-amanitina a esta concentración, por lo tanto la síntesis de RNA resultará inhibida.



6



SÍNTESIS DE PROTEÍNAS: TRADUCCIÓN Y MODIFICACIONES POSTRADUCCIÓN

Dohn Glitz

6.1 VISIÓN GENERAL 234

6.2 COMPONENTES DEL APARATO DE TRADUCCIÓN 234

El RNA mensajero transmite la información presente en el DNA 234
El RNA de transferencia actúa como molécula traductora bilingüe 235
El código genético emplea un alfabeto nucleotídico de cuatro letras 235
Los codones del mRNA son palabras de tres letras 235
Puntuación 235
Las interacciones codón–anticodón permiten la lectura del RNA mensajero 236
El "descifrado" del código genético 237
Mutaciones 238
La aminoacilación del RNA de transferencia activa los aminoácidos para la síntesis de proteínas 239
Especificidad y fidelidad de las reacciones de aminoacilación 240
La biosíntesis de proteínas se realiza en los ribosomas 242

6.3 BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS 245

La traducción es direccional y colineal con el mRNA 245
El inicio de la síntesis de proteínas es un proceso complejo 245
La elongación es el proceso de formación secuencial de enlaces peptídicos 246
La terminación de la síntesis de polipéptidos require un codón de terminación 251
La traducción tiene un alto coste energético 251
La síntesis proteica en la mitocondria difiere ligeramente de la síntesis citoplasmática 251
Algunos antibióticos y toxinas inhiben la biosíntesis de proteínas 254

6.4 MADURACIÓN DE LAS PROTEÍNAS: PLEGAMIENTO, MODIFICACIÓN, SECRECIÓN Y DESTINO 255

Las chaperonas facilitan el plegamiento de las proteínas 255
Las proteínas para la exportación siguen la ruta secretora 256
La glucosilación de proteínas tiene lugar en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi 257

6.5 DIRECCIONAMIENTO A MEMBRANAS Y ORGÁNULOS 262

La selección de las proteínas destinadas a los lisosomas tiene lugar en la ruta secretora 262
La importación de proteínas por las mitocondrias requiere señales específicas 262
El destino a otros orgánulos requiere señales específicas 264

6.6 OTRAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS 265

La insulina y los zimógenos son activados por proteólisis parcial 265
Los aminioácidos pueden ser modificados tras su incorporación en las proteínas 266
La biosíntesis del colágeno requiere muchas modificaciones postraducción 268
Formación del procolágeno en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi 268
Maduración del colágeno 269

6.7 REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN 271

6.8 DEGRADACIÓN Y RECAMBIO DE PROTEÍNAS 272

La proteólisis dependiente de ATP tiene lugar en los proteasomas 272
La digestión intracelular de algunas proteínas tiene lugar en los lisosomas 273
Hay muchos otros sistemas proteolíticos 273

BIBLIOGRAFÍA 274

PREGUNTAS 275

RESPUESTAS 276

APLICACIONES CLÍNICAS

6.1 Mutaciónes de cambio de sentido: la hemoglobina 238
6.2 Enfermedades relacionadas con los codones de terminación 238

6.3 α-Talasemia 239
6.4 Cambio programado del marco de lectura en la biosíntesis de las proteínas del VIH 241
6.5 La mutación del RNA ribosómico mitocondrial causa la sordera inducida por antibióticos 254
6.6 Deleción de un codón, modificación postraducción incorrecta y degradación proteica prematura: fibrosis quística 256
6.7 Plegamiento defectuoso y agregación: enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de las vacas locas, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington 257
6.8 Enfermedad de las células I 263
6.9 Hiperproinsulinemia familiar 266
6.10 Ausencia de modificaciones postraducción: deficiencia múltiple de sulfatasas 267
6.11 Defectos de la síntesis del colágeno 270

6.1 VISIÓN GENERAL

La información genética es almacenada y transmitida en el alfabeto de cuatro letras del lenguaje del DNA y expresada finalmente en el alfabeto de 20 letras del lenguaje de las proteínas. La biosíntesis de proteínas se conoce también como **traducción**, ya que implica la traducción bioquímica de información entre estos lenguajes. La traducción requiere diversas especies de RNA: una molécula de RNA mensajero que contiene la información y que se exporta desde el núcleo, varios tipos de RNA de transferencia "bilingües" que leen el mensaje y ribosomas ricos en RNA que actúan como centros catalíticos y de organización en la síntesis proteica. Los polipéptidos se forman por adición secuencial de aminoácidos, en el orden especificado por la información contenida en la secuencia de nucleótidos del mRNA. El plegamiento en la estructura tridimensional correcta puede requerir la asistencia de una chaperona proteica. La proteína sufre a menudo procesos de maduración y modificaciones postraducción, que pueden determinar la localización intracelular o la secreción fuera de la célula, o pueden modular su actividad o su función. Estos complejos procesos se llevan a cabo con una notable rapidez y precisión, y se regulan tanto de manera global como para cada proteína específica. Finalmente, si una proteína es traducida incorrectamente, ya no es necesaria o pierde funcionalidad es degradada y sus aminoácidos son catabolizados o reciclados para formar nuevas proteínas.

Las necesidades y la capacidad de sintetizar proteínas varían considerablemente en los distintos tipos celulares. Los eritrocitos maduros completamente diferenciados carecen de los componentes del aparato biosintético, no pueden sintetizar proteínas y tienen un período de vida de unos 120 días. Otras células necesitan mantener sus niveles enzimáticos y de otras proteínas y para permanecer viables llevan a cabo una síntesis limitada de proteínas. Las células en proceso de crecimiento y división deben sintetizar cantidades mucho más importantes de proteínas, además, algunas células también sintetizan proteínas para la exportación. Por ejemplo, las células hepáticas sintetizan grandes cantidades de enzimas, necesarias en múltiples rutas metabólicas, además de otras proteínas para la exportación, como la seroalbúmina, la principal proteína del suero o plasma sanguíneo. Las células hepáticas son factorías para la síntesis de proteínas y disponen de una maquinaria particularmente eficaz para sintetizarlas.

6.2 COMPONENTES DEL APARATO DE TRADUCCIÓN

El RNA mensajero transmite la información presente en el DNA

La información genética de la célula es heredada y almacenada en las secuencias nucleotídicas del DNA. La expresión selectiva de esta información requiere su transcripción en forma de moléculas de mRNA que transportan mensajes específicos y precisos desde el "banco de datos" del núcleo hasta los puntos de síntesis proteica situados en el citoplasma. En los eucariotas, los mensajeros, mRNA, son sintetizados a menudo en forma de grandes moléculas precursoras, que son modificadas antes ser exportadas al citoplasma (véase p. 222). El mRNA eucariótico maduro posee ciertas características que lo identifican. Es casi siempre **monocistrónico**, es decir, codifica una única cadena polipeptídica. Posee un "casquete" en el extremo 5′ formado por **7-metilguanosina**, unida al extremo del mensajero a través de un puente 5′-trifosfato (véase p. 225). Una región 5′ no traducida, que puede ser corta o de hasta unos pocos centenares de nucleótidos, separa el casquete de la **señal de iniciación** de la traducción. Esta señal suele ser, aunque no siempre, la primera se-

cuencia **AUG** encontrada cuando el mensaje es leído en dirección 5′ → 3′. Las secuencias que especifican una única secuencia polipeptídica se disponen sin interrupciones tras la señal de iniciación, hasta alcanzar una señal específica de terminación de la traducción. A continuación, se encuentra una secuencia 3′ no traducida, normalmente de unos 100 nucleótidos de longitud, que precede a la cola de poliadenilato de unos 100 a 200 nucleótidos, con la que finaliza el mensajero.

El mRNA procariótico difiere del eucariótico por no poseer el casquete 5′, si bien retiene un trifosfato terminal desde la iniciación de su síntesis por la RNA polimerasa. Por otra parte, muchos mensajeros son **policistrónicos**, es decir, codifican varios polipéptidos, y contienen más de una secuencia AUG de iniciación. A unos 10 nucleótidos del lado 5′ de una señal AUG de iniciación válida se encuentra una secuencia de posicionamiento en los ribosomas. A continuación de la señal de finalización hay una región no traducida, pero no hay una cola de poliadenilato.

El RNA de transferencia actúa como molécula traductora bilingüe

Todas las moléculas de tRNA poseen características estructurales comunes, como la secuencia 3′ terminal CCA a la que se unen los aminoácidos, una estructura secundaria muy conservada en hoja de trébol, y una estructura tridimensional en forma de L (véase p. 80). Sin embargo, cada una de las distintas especies moleculares posee una secuencia nucleotídica única, que confiere características individuales, que hacen que las interacciones con el mRNA y con la aminoacil tRNA sintetasa, que acopla un aminoácido específico al tRNA, sean de gran especificidad.

El código genético emplea un alfabeto nucleotídico de cuatro letras

En la célula, la información se almacena en el DNA, en forma de secuencias lineales de nucleótidos, análogas a la secuencia lineal de letras del alfabeto que forman las palabras que estamos utilizando. El lenguaje genético del DNA usa un **alfabeto de cuatro letras**, que consta de dos purinas, A y G (adenina y guanina) y dos pirimidinas, C y T (citosina y timina). En el mRNA, la información también está codificada mediante un alfabeto de cuatro letras similar al anterior, en el cual la base U (uracilo) sustituye a la T. El lenguaje del RNA es, pues, un dialecto del lenguaje genético del DNA. La información genética se **expresa** principalmente en forma de proteínas, cuyas propiedades derivan de su secuencia lineal de aminoácidos. Por consiguiente, en el proceso de biosíntesis de proteínas, el lenguaje de cuatro letras de los ácidos nucleicos es **traducido** al lenguaje de 20 letras de las proteínas. En la analogía con el lenguaje se encuentra implícita la direccionalidad de estas secuencias. Por convención, las secuencias nucleotídicas se escriben en dirección 5′ → 3′, y las proteicas desde el extremo amino al carboxilo. Estas direcciones corresponden al sentido de lectura y al de biosíntesis.

Los codones del mRNA son palabras de tres letras

Una correspondencia 1:1 entre nucleótidos y aminoácidos permitiría que el mRNA codificara sólo 4 aminoácidos, mientras que con una correspondencia 2:1 podrían codificarse $4^2 = 16$ aminoácidos. Ambas son insuficientes para los 20 aminoácidos que se encuentran formando parte de las proteínas. El código genético de tres letras efectivamente utilizado tiene $4^3 = 64$ permutaciones o palabras, que son suficientes para codificar también las señales de iniciación y terminación, que desempeñan el papel de la puntuación. Las palabras de tres bases se denominan **codones**, y habitualmente se presentan tal como se muestra en la Tabla 6.1. Dos aminoácidos están representados por un solo codón: metionina por AUG y triptófano por UGG. El resto de los aminoácidos están representados por dos, tres, cuatro o seis codones. La multiplicidad de codones para un aminoácido es una muestra de la **degeneración** del código. El código genético es casi **universal**. El mismo código de letras es utilizado en todos los organismos vivos, procariotas y eucariotas. La excepción a la universalidad del código son las mitocondrias, en las cuales unos pocos codones poseen un significado distinto que en el citoplasma del mismo organismo (Tabla 6.2).

Puntuación

Cuatro codones funcionan parcial o totalmente como signos de puntuación, señalando el inicio y el final de la síntesis proteica. La **señal de inicio**, **AUG**, también especifica el aminoácido metionina. Un triplete AUG en la localización apropiada

TABLA 6.1 El código genético[a]

Base 5′	U	C	A	G	Base 3′
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

[a] El código genético está formado por 64 codones que son permutaciones de cuatro bases tomadas de tres en tres. Obsérvese la importancia de la secuencia: tres bases, cada una de las cuales se usa sólo una vez en cada triplete, dan seis permutaciones: ACG, AGC, GAC, GCA, CAG y CGA, para treonina, serina, aspartato, alanina, glutamina y arginina, respectivamente.

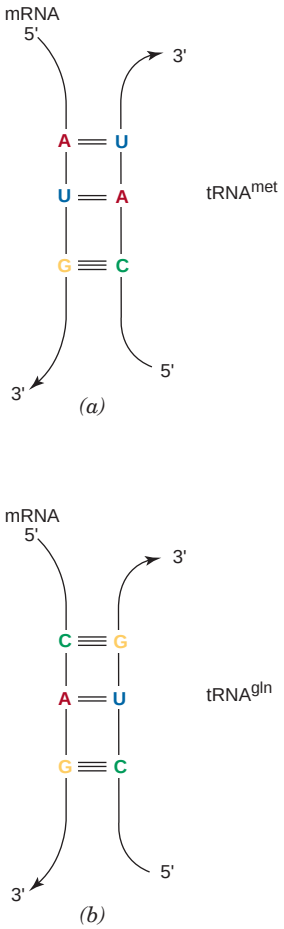


FIGURA 6.1
Interacciones codón–anticodón.
En la figura se ilustran las interacciones entre (*a*) el codón de la metionina, AUG, y su anticodón, CAU, y entre el de la glutamina, CAG, y su anticodón, CUG (*b*). Obsérvese que el apareamiento del mRNA con el tRNA es antiparalelo.

del mRNA indica la metionina como el residuo inicial o *N*-terminal. Los codones AUG situados en cualquier otro lugar del mensaje especifican residuos de metionina dentro de la proteína. Los tres codones UAG, UAA y UGA son **señales de paro** que no especifican ningún aminoácido, y se conocen como **codones de terminación** o, no tan convenientemente, como **codones sin sentido**.

Las interacciones codón–anticodón permiten la lectura del mRNA

Las traducción de los codones del mRNA implica la interacción directa con **secuencias anticodón** complementarias en los tRNA. Cada tipo de tRNA es portador de un único aminoácido y de una secuencia anticodón específica de tres bases. Igual que el apareamiento en el DNA, el apareamiento codón-anticodón es **antiparalelo**, como se muestra en la Figura 6.1, y los codones son leídos en **un marco secuencial sin solapamiento**. El anticodón y el sitio aceptor del aminoácido están localizados en extremos opuestos en todas las moléculas de tRNA (véase la p. 82). El tRNA actúa, física y conceptualmente, como un puente entre la secuencia nucleotídica del mRNA unido al ribosoma y el centro de ensamblaje de proteínas del ribosoma.

Dado que existen 61 codones disponibles para designar 20 aminoácidos, puede parecer necesaria la presencia de un número igual de especies distintas de tRNA. No es éste el caso. Se ha observado que las desviaciones del apareamiento de bases estándar son frecuentes en las interacciones codón–anticodón. Muchos aminoácidos pueden ser transportados por más de una especie de tRNA, y los codones degenerados pueden ser leídos por más de un tRNA (pero siendo siempre cada uno portador del aminoácido correcto). La complejidad de estas interacciones puede explicarse

TABLA 6.2 Excepciones a la universalidad del código genético en las mitocondrias de mamíferos

Codón	*Código general*	*Código de la mitocondria*
UGA	Terminación	Triptófano
AUA	Isoleucina	Metionina
AGA	Arginina	Terminación
AGG	Arginina	Terminación

en gran parte mediante la **hipótesis del "balanceo"**, que permite una menor rigidez en el apareamiento entre la primera posición del anticodón y la posición degenerada (tercera) del codón. Un segundo modulador de las interacciones codón–anticodón es la presencia de **nucleótidos modificados** en o al lado de la primera posición del anticodón en muchas especies de tRNA. Un nucleótido frecuente en los anticodones es el ácido inosínico (I), el nucleótido de la hipoxantina, que se aparea con U, C o A. Las reglas del balanceo se muestran en la Tabla 6.3.

Según las reglas del balanceo, los 61 codones que no especifican puntuación pueden ser leídos por tan sólo 31 moléculas de tRNA, aunque la mayoría de células poseen 50 o más especies de tRNA. Algunos codones son leídos con mayor eficiencia por un anticodón que por otro. No todos los codones se utilizan con igual frecuencia, algunos lo son muy raramente. La observación de un gran número de secuencias de mRNA ha permitido construir unas tablas de "utilización de codones", que muestran las preferencias de los distintos organismos en el empleo de diferentes codones para generar secuencias polipéptidas similares.

TABLA 6.3 Reglas del balanceo en el apareamiento de bases

Base en 3′ del codón	*Posibles bases en 5′ del anticodón*
A	U o I
C	G o I
G	C o U
U	A o G o I

El "descifrado" del código genético

El código genético (Tabla 6.1) fue determinado antes del desarrollo de las técnicas de secuenciación de los mRNA naturales. Los experimentos destinados a descifrar el código genético usaron mRNA artificiales simples o codones de tres nucleótidos obtenidos por síntesis química.

La **polinucleótido fosforilasa** cataliza la reacción reversible e independiente de molde:

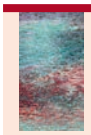
$$x\text{NDP} \rightleftharpoons \text{polinucleótido}\,(\text{pN})_x + x\text{P}_\text{i}$$

donde NDP es un nucleósido 5′-difosfato cualquiera, o una mezcla de dos o más. Si el nucleósido difosfato es UDP, se forma un polímero de U, denominado poli(U). La síntesis proteica *in vitro* con poli (U) como mRNA genera la "proteína" polifenilalanina. De la misma forma, el poli(A) codifica polilisina y el poli(C) poliprolina. Un mRNA constituido por una secuencia aleatoria que contenga únicamente U y C produce polipéptidos formados no sólo por prolina y fenilalanina, como es de esperar, sino también por serina (de UCU y UCC) y leucina (de CUU y CUC). Los experimentos con secuencias aleatorias de mRNA son de difícil interpretación, debido a la degeneración del código y a la complejidad de los productos, por lo que se emplearon mensajeros sintéticos con secuencias definidas, transcritos a partir de secuencias sencillas de DNA repetitivo. Así, un poli(AU) transcrito de una secuencia repetitiva poli(dAT) produce sólo un copolímero repetitivo de Ile-Tyr-Ile-Tyr, resultante de leer tripletes sucesivos AUA UAU AUA UAU, etc. Un poli(CUG) sintético contiene los posibles codones CUG (Leu), UGC (Cys) y GCU (Ala), siendo el tipo de repetición dependiente de la **pauta de lectura** escogida. Dado que la selección del codón de iniciación en estos experimentos *in vitro* es aleatoria, pueden producirse tres homopolipéptidos distintos: polileucina, policisteína y polialanina. Un poli(CUCG) perfecto produce un único polipéptido con la secuencia (-Leu-Ala-Arg-Ser-), con independencia del punto de iniciación. En la Tabla 6.4 se resumen estas relaciones; muestran que los codones están formados por tripletes que son leídos en la secuencia correcta, sin solapamientos ni omisiones. Otros experimentos utilizaron como mensajeros mínimos codones formados por trinucleótidos. No se sintetizaron proteínas, pero los codones utilizados estimularon la unión de un único aminoácido (conjugado con el tRNA adecuado) al ribosoma. El significado de cada posible codón fue verificado más tarde mediante la determinación de las secuencias de mRNA.

TABLA 6.4 Productos polipeptídicos de mRNA sintéticos[a]

mRNA	*Secuencias de codones*	*Productos*
—$(AU)_n$—	—⌈AUA⌋ ⌊UAU⌋ ⌈AUA⌋ ⌊UAU⌋ —	—$(\text{Ile-Tyr})_{n/3}$—
—$(CUG)_n$—	—⌈CUG⌋ ⌊CUG⌋ ⌈CUG⌋ ⌊CUG⌋ —	—Leu_n—
	—⌈UGC⌋ ⌊UGC⌋ ⌈UGC⌋ ⌊UGC⌋ —	—Cys_n—
	—⌈GCU⌋ ⌊GCU⌋ ⌈GCU⌋ ⌊GCU⌋ —	—Ala_n—
—$(CUCG)_n$—	⌈CUC⌋ ⌊GCU⌋ ⌈CGC⌋ ⌊UCG⌋	—$(\text{Leu-Ala-Arg-Ser})_{n/3}$—

[a] Los corchetes horizontales ponen de relieve el marco de la lectura.



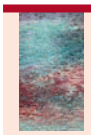
APLICACIÓN CLÍNICA 6.1
Mutaciones de cambio de sentido: La hemoglobina

La mutación sustitutiva más importante desde el punto de vista clínico que afecta la estructura de la hemoglobina es el cambio de A por U en cualquiera de los codones del glutamato GAA o GAG para dar los codones de la valina GUA o GUG en la sexta posición de la cadena β de la hemoglobina. Se estima que 1 de cada 10 afroamericanos son portadores de esta mutación, que en los homocigotos es causa de anemia falciforme, la más común de las hemoglobinopatías. La segunda hemoglobinopatía más frecuente es la enfermedad de la hemoglobina C, en la que un cambio de G a A en cualquiera de los codones del glutamato GAA y GAG da lugar a un codón de lisina AAA o AAG en la sexta posición de la cadena β. Se conocen centenares de mutaciones por sustitución en la hemoglobina (véanse las Apli. Clín. 2.4 y 9.6). Un avance reciente en la terapia de la anemia falciforme se basa en el tratamiento con hidroxiurea para estimular la síntesis de las cadenas γ, y de esta manera aumentar la producción de hemoglobina fetal en los adultos afectados. Ello disminuye la tendencia de la HbS a formar multímeros lineales en los eritrocitos, que provoca una distorsión en forma de hoz cuando disminuye la tensión de oxígeno. Las hemoglobinopatías son un importante objetivo de la terapia génica.

Charache, S., Terrin, M. L., Moore, R. D., Dover, G. J., et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 332:1317, 1995; y Persons, D. A. y Nienhuis, A. W. Gene therapy for the hemoglobin disorders: past, present, and future. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:5022, 2000.

Mutaciones

El conocimiento del código genético y del modo como se lleva a cabo su lectura proporciona un punto de partida para comprender la naturaleza de las mutaciones. Una mutación es simplemente un cambio en un gen. Las **mutaciones puntuales** implican un cambio de un único par de bases del DNA y, por consiguiente, de una sola base en el mRNA. Cuando el cambio ocurre en la tercera base de un codón degenerado no se produce variación en el aminoácido especificado (p.e., UCC y UCA codifican ambos la serina). Estas **mutaciones silenciosas** sólo pueden ser detectadas por secuenciación del gen. Estas variaciones se suelen observar cuando se comparan genes que codifican proteínas similares en distintos organismos, como en el caso de las hemoglobinas de diferentes especies. Las **mutaciones de cambio de sentido** son el resultado del cambio de una base que da lugar a la incorporación de un aminoácido distinto en la proteína codificada (véase la Apli. Clín. 6.1). Las mutaciones puntuales pueden también formar o destruir un codón de terminación y, por lo tanto, cambiar la longitud de la proteína. La formación de un codón de terminación a partir de uno que codifica un aminoácido (véase la Apli. Clín. 6.2) se denomina a menudo **mutación sin sentido**, y causa la terminación prematura y una proteína más corta. La mutación de un codón de terminación en uno que especifique un aminoácido permite que el mensaje siga siendo leído hasta encontrar otro codón de parada. El resultado es una proteína más larga de lo normal. Este fenómeno es la causa de diversas enfermedades (véase la Tabla 6.5 y la Apli. Clín. 6.3).



APLICACIÓN CLÍNICA 6.2
Enfermedades relacionadas con los codones de terminación

En la hemoglobina McKees Rocks, el codón UAU o UAC, que normalmente designa la tirosina en la posición 145 de la cadena β, ha mutado dando el codón de terminación UAA o UAG. Como consecuencia, la cadena β sufre un acortamiento desde los 146 residuos normales a 144 residuos, cambio que confiere a la hemoglobina un afinidad inusualmente elevada por el oxígeno, ya que se ha modificado la secuencia C-terminal normal implicada en la fijación del 2,3-bisfosfoglicerato. La compensación de la disminución en la liberación de oxígeno mediante un aumento de la secreción de eritropoyetina por el riñón y de la producción de glóbulos rojos da como resultado un fenotipo policitémico.

Otra enfermedad que es consecuencia de una mutación terminadora es una variedad de la β-talasemia. Las talasemias son un grupo de enfermedades caracterizadas a nivel molecular por un desequilibrio en la estequiometría de la síntesis de globina α y β. En la talasemia β^0 no se sintetiza β-globina. Como consecuencia, la α-globina, que no se puede asociar con la β-globina para formar hemoglobina, se acumula y precipita en los eritrocitos. La precipitación daña las membranas celulares, produciendo anemia hemolítica y estimulanción de la eritropoyesis. Una variedad de talasemia β^0, común en el sudeste de Asia, es el resultado de una mutación terminadora en el codón 17 de la β-globina; el codón normal AAG, que designa un residuo de lisina en β-17, se transforma en un codón de terminación UAG. A diferencia de la hemoglobina McKees Rocks, en la que la mutación terminadora se encuentra al final del mensaje de la β-globina, la mutación terminadora de la talasemia β^0 tiene lugar tan al inicio del mRNA que no se puede sintetizar ninguna secuencia parcial útil de β-globina. Ello provoca anemia y agregación de la α-globina no utilizada en los precursores de los eritrocitos. Además, los niveles de mRNA de la β-globina están disminuidos, probablemente a causa de una terminación prematura de la traducción que causa inestabilidad del mRNA.

Winslow, R. M., Swenberg, M. L., Gross, E., Chervenick, P. A., Buchman, R. R. y Anderson, W. F. Hemoglobin McKees Rocks ($\alpha_2\ \beta_2\ ^{145\ Tyr\rightarrow term}$). A human nonsense mutation leading to a shortened β chain. *J. Clin. Invest.* 57:772, 1976; y Chang, J. C. y Kan, Y. W. β-Thalassemia: a nonsense mutation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2886, 1979.

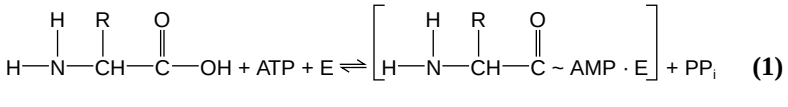
TABLA 6.5 Mutaciones en el codón de terminación que producen α-globinas anormalmente largas

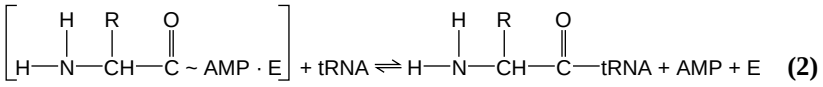
Hemoglobina	*Codón α 142*	*Amino-ácido 142*	*Longitud de la α-Globina (Residuos)*
A	UAA		141
Constant Spring	CAA	Glutamina	172
Icaria	AAA	Lisina	172
Seal Rock	GAA	Glutamato	172
Koya Dora	UCA	Serina	172

La inserción o la deleción de un único nucleótido dentro de la región codificante de un gen causa una **mutación de desplazamiento del marco de lectura**. El marco de lectura se encuentra alterado en este punto, y los codones siguientes se leen en el nuevo marco hasta llegar a un codón de terminación. La Tabla 6.6 ilustra este fenómeno en el caso de la hemoglobina mutante Wayne. La importancia de la selección del marco de lectura se pone claramente de manifiesto en un fenómeno que se produce en algunos virus muy pequeños, cuyo tamaño limita la cantidad de DNA que pueden contener. En compensación, un único segmento de DNA codifica distintas cadenas polipeptídicas, que son traducidas a partir de pautas de lectura diferentes. Un ejemplo lo constituye el virus causante de tumores en simios SV40 (Figura 6.2). Otros virus recurren al cambio de la pauta de lectura durante la traducción para generar diferentes proteínas a partir de un único mensaje (véase la Apli. Clín. 6.4)

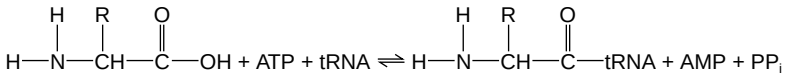
La aminoacilación del RNA de transferencia activa los aminoácidos para la síntesis de proteínas

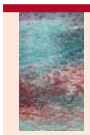
Para ser incorporados a las proteínas, los aminoácidos deben ser previamente "activados" mediante la unión a su tRNA transportador correspondiente. Este proceso en dos etapas está catalizado por una familia de **aminoacil-tRNA sintetasas**, cada una de las cuales es específica para un único aminoácido y la especie de tRNA correspondiente. Las reacciones se escriben generalmente del siguiente modo:





Suma:





APLICACIÓN CLÍNICA 6.3
α-Talasemia

En cada cromosoma 17 se expresan dos genes de α-globina. Muchos tipos de α-talasemia están causados por la deleción de dos, de tres o de las cuatro copias del gen de la α-globina. La gravedad clínica aumenta con el número de genes delecionados. En cambio, los trastornos enumerados en la Tabla 6.5 son formas de α-talasemia originadas por cadenas de α-globina anormalmente largas que reemplazan la forma normal de α-globina, presentes sólo en pequeñas cantidades como resultado de una velocidad de síntesis disminuida o, más probablemente, de una más rápida degradación de la α-globina anormal. El codón normal de terminación, UAA, de la α-globina muta a uno cualquiera de cuatro codones con sentido, y así la posición 142 pasa a estar ocupada por uno de cuatro aminoácidos diferentes. La α-globina normal tiene 141 aminoácidos de longitud, pero las cuatro α-globinas anormales tienen 172 aminoácidos de longitud, gracias a la conversión de un triplete de nucleótidos en la región normalmente no traducida en un codón de terminación en la posición 173. Las inserciones y desplazamientos del marco de lectura también pueden originar cadenas de globina anormalmente largas.

Weatherall, D. J. y Clegg, J. B. The α-chain termination mutants and their relationship to the α-thalassemias. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 271:411, 1975.

TABLA 6.6 Una mutación de desplazamiento del marco de lectura produce la hemoglobina anormal Wayne[a]

Posición	*137*	*138*	*139*	*140*	*141*	*142*	*143*	*144*	*145*	*146*	*147*
Secuencia de aminoácidos de la globina α normal	- Thr	- Ser	- Lys	- Tyr	- Arg						
Secuencia de codones de la globina α normal	- ACP	- UC(U)	- AAA	- UAC	- CGU	- UAA	- GCU	- GGA	- GCC	- UCG	- GUA
Secuencia de codones de la globina α Wayne	- ACP	- UCA	- AAU	- ACC	- GUU	- AAG	- CUG	- GAG	- CCU	- CGG	- UAG
Secuencia de aminoácidos de la globina α Wayne	- Thr	- Ser	- Asn	- Thr	- Val	- Lys	- Leu	- Glu	- Pro	- Arg	

[a] La base eliminada responsable del desplazamiento del marco de lectura está marcada con un círculo. Los codones de terminación aparecen enmarcados
P = A, G, U, o C.

Los corchetes que limitan el complejo enzima–aminoacil-AMP indican que se trata de un intermediario transitorio unido al enzima. El aminoacil-adenilato, un anhídrido mixto con componentes carboxilo y fosforilo, es un intermediario de "alta energía". El enlace éster aminoacilo en el tRNA posee un nivel de energía menor que el aminoaciladenilato, pero es aún superior al del aminoácido libre. Las **pirofosfatasas** rompen el pirofosfato liberado, y el equilibrio se desplaza fuertemente hacia la formación de aminoacil-tRNA. En cuanto a la precisión de la traducción, el aminoácido, sólo distinguible por su cadena lateral (grupo R), se acopla a un transportador de mayor tamaño y complejidad, más fácilmente reconocible.

Especificidad y fidelidad de las reacciones de aminoacilación

La mayor parte de células contienen 20 aminoacil-tRNA sintetasas distintas, cada una de las cuales es específica para un aminoácido y, como máximo, una pequeña familia de tRNA transportadores para cada aminoácido. Puesto que las interacciones codón–anticodón definen el aminoácido que deberá ser incorporado, si el tRNA transporta un aminoácido incorrecto, se producirá un error en la proteína. La correcta selección del tRNA y del aminoácido por parte de las sintetasas es esencial para la fidelidad de la síntesis proteica.

Las aminoacil-tRNA sintetasas comparten un mecanismo común y muchas se encuentran además asociadas físicamente entre sí en el interior de la célula. Sin embargo, se trata de un grupo diverso de proteínas que pueden contener una, dos o

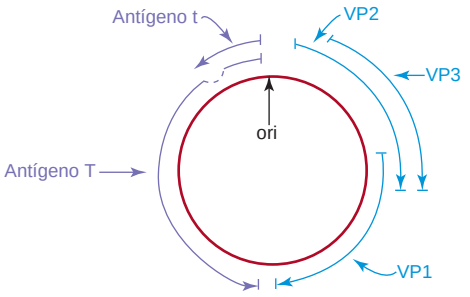
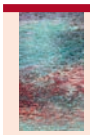


FIGURA 6.2
Mapa del genoma del virus 40 de los simios (SV40).
El DNA del SV40, mostrado en rojo, es un círculo de doble hebra de algo más de 5000 pares de bases que codifica toda la información requerida para la supervivencia y replicación del virus dentro de la célula que lo hospeda. Es un ejemplo de uso extremadamente eficiente del potencial de codificación de información de un pequeño genoma. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 son componentes estructurales del virus; VP2 y VP3 se traducen a partir de distintos puntos de iniciación hasta un único extremo carboxilo. La proteína VP1 se traduce con un marco de lectura distinto, de modo que su región amino-terminal se solapa con los genes de VP2 y VP3, aunque la secuencia de aminoácidos en el segmento solapado es diferente de la de VP2 y VP3. Dos proteínas adicionales, los antígenos tumorales mayor (T) y menor (t), que promueven la transformación de las células infectadas, poseen secuencias amino-terminales idénticas. El segmento carboxi-terminal de la proteína t está codificado en una región del mRNA que es eliminada por corte y empalme del mensajero más largo de la proteína T, mientras que la secuencia carboxi-terminal de la proteína T está codificada por una secuencia de DNA que se encuentra a continuación del sitio de terminación de la proteína t. Estos procesos tienen lugar mediante la maduración diferencial de un mRNA precursor común. El origen de replicación del DNA es único (ori), y se encuentra fuera de las regiones codificadoras del genoma.



APLICACIÓN CLÍNICA 6.4

Cambio programado del marco de lectura en la biosíntesis de las proteínas del VIH

El mantenimiento de la pauta de lectura es esencial para la precisión y la fidelidad de la traducción. Sin embargo, muchos retrovirus, incluido el VIH, el virus de la inmunodeficiencia humana que provoca el SIDA, aprovechan el deslizamiento del mRNA y un cambio del marco de lectura para generar diferentes proteínas a partir del mismo mensajero. Un solo mRNA, el mensajero *gag-pol*, codifica dos poliproteínas solapadas por unos 200 nucleótidos y en diferentes marcos de lectura. La poliproteína gag se traduce desde el codón de iniciación hasta un codón de terminación en fase, cercano a la unión *gag-pol*; a continuación, la proteína gag es cortada para generar varias proteínas estructurales del virus. Sin embargo, con una frecuencia de un 5% se produce un desplazamiento del marco de lectura de un nucleótido en el segmento de solapamiento del mRNA, y el codón de terminación es ignorado porque ya no se encuentra en fase de lectura. En este caso se produce una poliproteína de fusión gag-pol; el corte proteolítico de la poliproteína pol genera la transcriptasa inversa vírica y otras proteínas necesarias para la reproducción del virus.

Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A. y Varmus, H. E. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331:280, 1988.

cuatro subunidades idénticas, o bien pares de subunidades distintas. El estudio detallado de estos enzimas indica que en la formación de aminoaciladenilatos, en el reconocimiento de los tRNA y, si se da el caso, en las interacciones entre subunidades, intervienen dominios estructurales separados. A pesar de su diversidad estructural, cada enzima es capaz de llevar a cabo la formación de los complejos aminoacil-tRNA correctos sin cometer prácticamente errores.

La selección del aminoácido correcto requiere un grado considerable de discriminación por parte de algunas sintetasas. Mientras que algunos aminoácidos pueden ser reconocidos fácilmente por su tamaño (grande el del triptófano y pequeño el de la glicina), o por la carga positiva o negativa de sus cadenas laterales (lisina o glutamato), otros son de más difícil discriminación. La discriminación entre la valina y la treonina o la isoleucina por la valil-tRNA sintetasa es difícil debido a que las cadenas laterales de estos aminoácidos sólo difieren por la adición de un grupo hidroxilo o por un único grupo metileno. Los sitios de reconocimiento y activación del aminoácido en cada enzima tienen una gran especificidad, pero ocasionalmente se produce un reconocimiento erróneo. Un paso adicional de **corrección de errores** incrementa el grado de discriminación. Este paso consiste frecuentemente en la hidrólisis del intermediario aminoacil-adenilato, con liberación del aminoácido y AMP. La valil-tRNA sintetasa hidroliza de manera eficiente el treonil-adenilato e hidroliza el isoleucil-adenilato en presencia de $tRNA^{Val}$ unido (pero no aminoacilado). En otros casos el tRNA acilado incorrectamente es reconocido y desacilado. Las valil-, fenilalanil- e isoleucil-tRNA sintetasas desacilan los tRNA cargados erróneamente con treonina, tirosina y valina, respectivamente. Esta corrección de pruebas es análoga a la edición de los nucleótidos incorporados erróneamente mediante la actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ de las DNA polimerasas (véase p. 164). La edición puede ser llevada a cabo por muchas, pero no por todas las tRNA sintetasas. El resultado neto final es de una acilación incorrecta por cada 10^4 a 10^5.

Cada una de las sintetasas también debe ser capaz de reconocer correctamente una o varias especies de tRNA, que sirven para la incorporación correcta del mismo aminoácido, y de rechazar otras especies incorrectas de tRNA. Teniendo en cuenta la complejidad de las moléculas de tRNA, esta selección debería ser más simple que la selección de un único aminoácido. Sin embargo, recuérdese la similitud conformacional y los elementos de secuencia comunes de todos los tRNA (véase p. 82). Sintetasas diferentes reconocen elementos estructurales diferentes del tRNA. Múltiples elementos estructurales contribuyen habitualmente al reconocimiento, pero no hay determinantes absolutos. El anticodón, específico para cada aminoácido, es un elemento lógico en el reconocimiento del tRNA por la sintetasa. En el caso del $tRNA^{Met}$, el cambio del anticodón también altera el reconocimiento por la sintetasa. En otros casos es así sólo en parte, y a veces el anticodón no es un determinante de reconocimiento. Consideremos, por ejemplo, las **mutaciones supresoras** que "suprimen" la expresión de determinadas clases de mutaciones de terminación (sin sentido). Una mutación puntual en un codón de glutamina (CAG) produce un codón de terminación (UAG) que causa la terminación prematura de la proteína codificada. Una segunda mutación supresora en el anticodón de un $tRNA^{Tyr}$, en que el anticodón GUA normal se transforma en CUA, per-

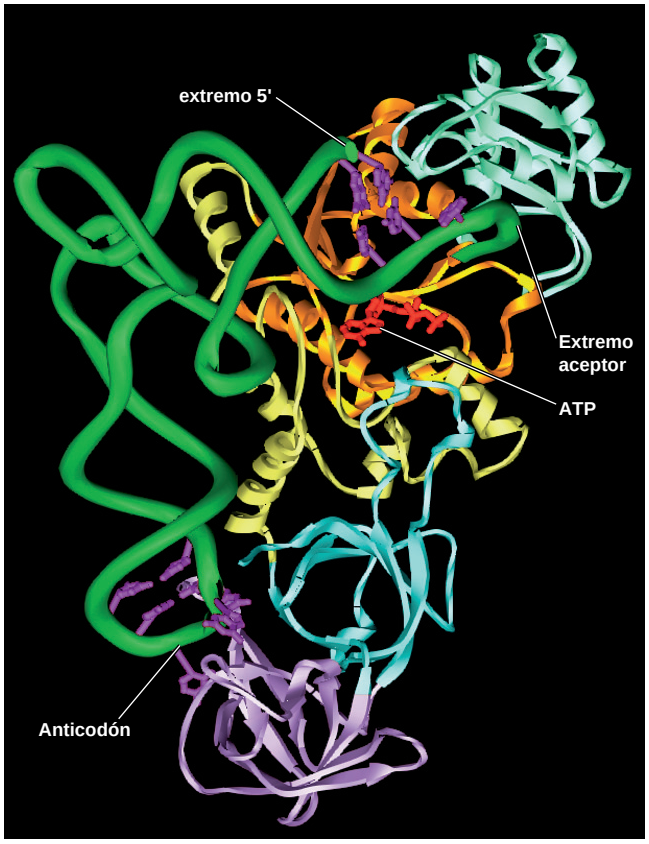


FIGURA 6.3
Interacción de un tRNA con su correspondiente aminoacil-tRNA sintetasa. La cadena de azúcar–fosfato del glutaminil tRNA de *E. coli* se representa en verde y en diversos colores el esqueleto peptídico de la glutamina $tRNA^{Gln}$ sintetasa. Obsérvense las fuertes interacciones de la sintetasa tanto con el brazo aceptor parcialmente desenrollado como con el bucle del anticodón del tRNA y, en rojo, la colocación del ATP, a unos pocos angstroms de distancia del extremo 3′ del tRNA. Los modelos espaciales mostrarían ambas moléculas como objetos compactos con contactos directos en varios lugares. *Adaptado de Perona, J., Rould, M. y Steitz, T.* Biochemistry *32:8758, 1993.*

mite "pasar de largo" el codón de terminación. La mutación inicial es suprimida, sintetizándose así una proteína casi normal, en la cual la glutamina ha sido sustituida por una tirosina. La aminoacilación del $tRNA^{Tyr}$ mutante con tirosina demuestra que, en este caso, el anticodón no determina la especificidad de la sintetasa. En el $tRNA^{Ala}$ de *E. coli*, la principal característica reconocida es un par de bases G_3-U_{70} en el tallo aceptor; incluso si no hay otros cambios en el $tRNA^{Ala}$, cualquier variación en esta posición destruye su capacidad aceptora por la alanina-$tRNA^{Ala}$ sintetasa. Otras características para la identificación de los tRNA incluyen elementos adicionales del brazo aceptor y, a veces, partes del bucle variable o del tallo/bucle-D. Diferentes segmentos del tRNA pueden ser reconocidos para la aminoacilación y la corrección de pruebas. La estructura determinada por rayos X del complejo glutaminil sintetasa–tRNA, que se muestra en la Figura 6.3, indica que la unión se produce en la superficie cóncava del tRNA, lo que es típico y compatible con las observaciones bioquímicas.

La biosíntesis de proteínas se realiza en los ribosomas

Las proteínas son sintetizadas en los **ribosomas**, que son complejas partículas **ribonucleoproteicas** formadas por dos subunidades distintas, constituidas por RNA y muchas proteínas. Con una sola excepción, hay una sola copia de cada proteína por subunidad, así como de cada especie de RNA. La arquitectura y la función de los ribosomas se ha conservado a lo largo de la evolución y las similitudes entre los ribosomas y las subunidades de distintas fuentes son más importantes que las diferencias. La composición de los principales tipos de ribosomas se muestra en la Tabla 6.7.

Los ribosomas y sus subunidades pueden ser cristalizados y la determinación de su estructura por difracción de rayos X está muy avanzada. La Figura 6.4 muestra la estructura de un ribosoma procariótico a 5,5 Å de resolución. Cada subunidad consta de un núcleo de RNA con una estructura tridimensional definida, sobre la cual se sitúan las proteínas mediante interacciones proteína-proteína y proteína-RNA.

TABLA 6.7 Clasificación y composición de los ribosomas

Origen de los ribosomas	*Tamaño del monómero*	*Subunidades*	
		Pequeña	*Grande*
Eucariotas			
Citosol	80S	40S: 34 proteínas 18S RNA	60S: 50 proteínas 28S, 5,8S, 5S RNA
Mitocondrias			
Animales	55S–60S	30S–35S: 12S RNA	40–45S: 16S RNA 70–100 proteínas
Plantas superiores	77S–80S	40S: 19S RNA	60S: 25S, 5S RNA 70–75 proteínas
Cloroplastos	70S	30S: 20–24 proteínas 16S RNA	50S: 34–38 proteínas 23S, 5S, 4.5S RNA
Procariotas			
Escherichia coli	70S	30S: 21 proteínas 16S RNA	50S: 34 proteínas 23S, 5S RNA

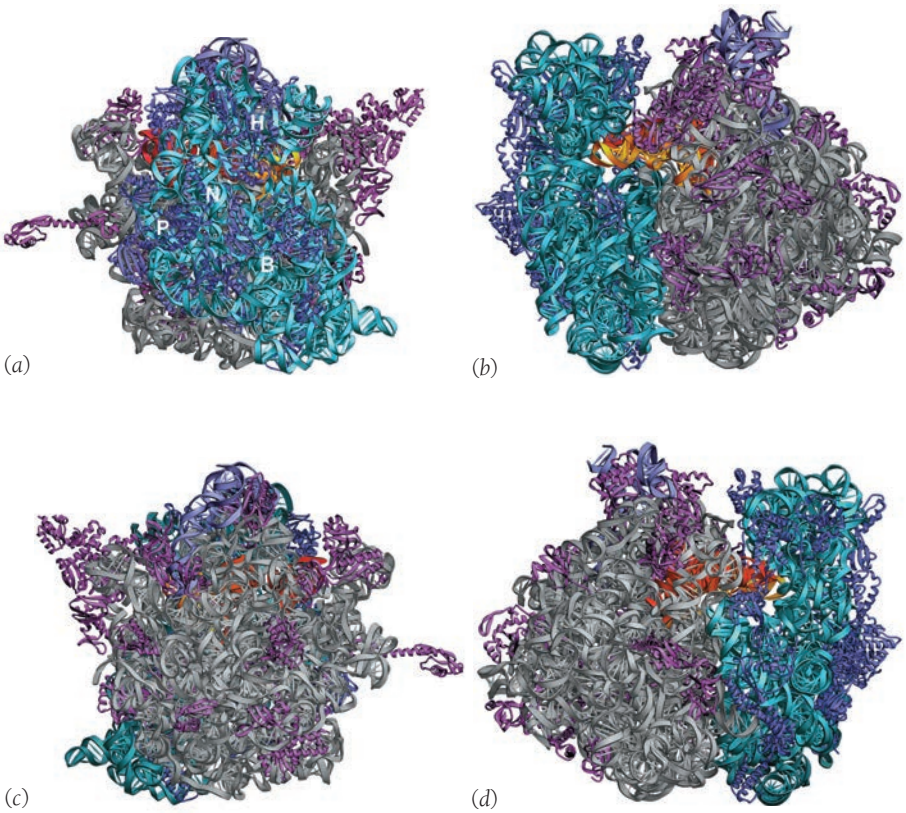


FIGURA 6.4
Estructura cristalográfica de un ribosoma 70S. Estructura del ribosoma de *Thermus thermophilus* a 5,5 Å de resolución. Las vistas sucesivas están giradas 90º alrededor del eje vertical. (*a*) La subunidad pequeña se encuentra sobre la subunidad grande. Entre las características de la subunidad pequeña se encuentran la cabeza (H) conectada al cuerpo (B) por un cuello (N) y la plataforma (P) que se proyecta hacia la subunidad grande. El RNA 16S es de color azul y las proteínas de la subunidad pequeña de color azul oscuro. (*b*) La subunidad grande se encuentra a la derecha; el RNA 23S se representa en gris; el RNA 5S en azul claro, y las proteínas de la subunidad grande en morado. El sitio A del tRNA (dorado) se extiende a las dos subunidades (*c*) La subunidad grande está encima con la protuberancia a la izquierda. (*d*) La subunidad grande está a la izquierda, y partes de los sitios E- y A del tRNA pueden observarse en la interfase entre las dos subunidades.
Reproducido con permiso de Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H.D. y Noller, J.H.F. Science *292:883, 2001 Copyrigt © 2001 by American Association for the Advancement of Science. Figura cedida generosamente por los Drs. A. Baucom y H. Noller. Véase también la Figura 6.5.*

Es posible distinguir algunas regiones helicoidales del RNA y algunas proteínas individuales en las estructuras cristalográficas. Información adicional obtenida con diversas técnicas ha permitido una comprensión más profunda de este gran complejo. Muchos experimentos han sido posibles gracias a la capacidad de **autoensamblaje** de los ribosomas procarióticos; es decir, las estructuras nativas pueden reconstituirse a partir de mezclas de proteínas individuales purificadas y de RNA. La **reconstitución** de subunidades a partir de mezclas de las que se omite o modifica uno solo de los componentes permite mostrar si, por ejemplo, se requiere cierta proteína para la asociación de las subunidades o para una función específica. La reconstitución completa de subunidades eucarióticas todavía no se ha logrado, pero las conclusiones sobre el funcionamiento de los ribosomas son aplicables a los sistemas eucarióticos.

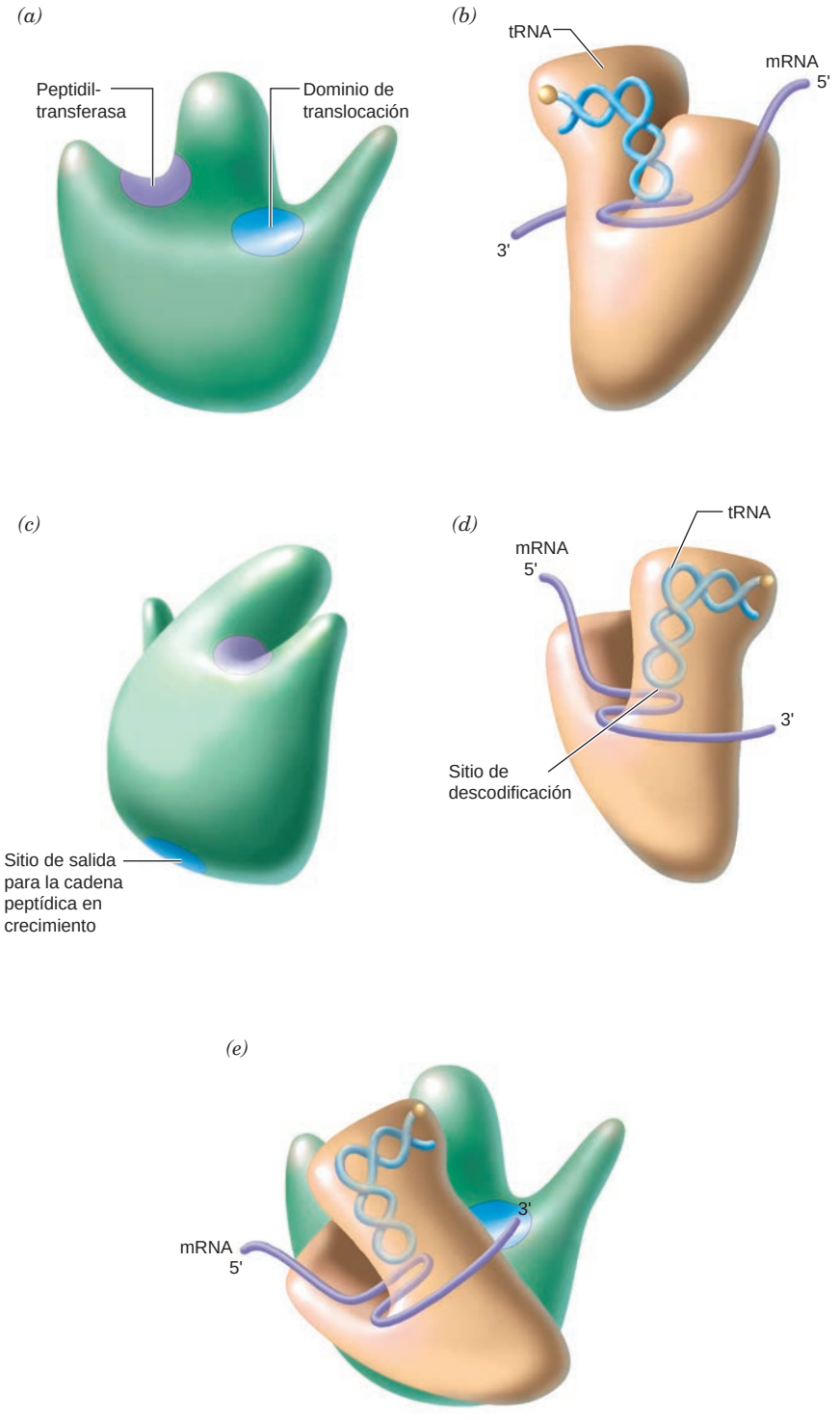


FIGURA 6.5
Estructura de los ribosomas y sitios funcionales.
La serie superior muestra las caras de cada subunidad que interaccionan en el ribosoma funcional. En (*a*) se muestra la subunidad grande; obsérvese que los sitios de formación del enlace peptídico y de unión de los factores de alargamiento tiene lugar en lados opuestos de la protuberancia central. La estructura en forma de brazo está formada por la proteína L7/L12 (o su equivalente eucariótico). En (*b*) la plataforma de la subunidad pequeña se proyecta hacia el lector. El mRNA y el tRNA interaccionan en un sitio descodificador situado en la hendidura entre la plataforma y el cuerpo de la subunidad. Se muestra la orientación del tRNA y del mRNA, aunque la observación de su interacción en el lugar descodificador está dificultada por la plataforma. En (*c*) la subunidad grande ha experimentado un giro de 90° y el brazo se proyecta hacia la página. La proteína recién sintetizada emerge del ribosoma por un sitio de salida cerca de la base. Esta región de la subunidad está en contacto con las membranas en los ribosomas unidos del retículo endoplasmático rugoso. El sitio de formación del enlace peptídico, es decir, el centro peptidil transferasa, está separado del sitio de salida; el péptido naciente ha de pasar a través de un canal o túnel hasta alcanzar el sitio de salida. En (*d*) se muestra la subunidad pequeña tras una rotación de 90°; la plataforma se proyecta hacia la cara de la subunidad grande para mostrar la hendidura. En (*e*) las dos subunidades se han unido para mostrar sus orientaciones relativas en el ribosoma. El aminoacil-tRNA unido a la subunidad pequeña está orientado con el extremo del aceptor cerca de la peptidil transferasa, mientras que el dominio de translocación (donde se unen EF-1 y EF-2) está cerca de la región descodificadora y del área por donde entra el mRNA en el complejo.

Los ribosomas y sus subunidades pueden visualizarse por microscopia electrónica. La localización de la mayoría de las proteínas ribosómicas, algunos elementos estructurales del RNA y los sitios funcionales de cada subunidad fueron determinados por microscopia electrónica de subunidades en presencia de anticuerpos contra un solo componente ribosómico. La molécula de anticuerpo actúa a modo de señal del sitio ribosómico. Se obtuvo información adicional mediante entrecruzamiento químico, que identifica vecinos próximos en la estructura y mediante mediciones de dispersión de neutrones, que permiten medir la distancia entre pares de proteínas. Las comparaciones de secuencia y las sondas enzimáticas y químicas suministran información de la conformación del RNA. La correlación de datos estructurales y funcionales ha permitido la elaboración de modelos de la síntesis proteica como el de la Figura 6.5, que relacionan la morfología de los ribosomas con su función en la traducción.

Los ribosomas se encuentran organizados en otras dos formas. En la primera, a menudo intervienen varios ribosomas en la traducción simultánea de una única molécula de mRNA. Los **polisomas** purificados unidos al mensajero pueden ser observados al microscopio electrónico (Figura 6.6). En la segunda, algunos ribosomas se encuentran libres en el citosol de las célula eucarióticas, pero muchos se encuentran unidos a las membranas del retículo endoplasmático rugoso. En general, los **ribosomas libres** sintetizan proteínas destinadas a permanecer en el citosol o a ser dirigidas al núcleo, las mitocondrias u otros orgánulos. Los **ribosomas unidos a membrana** sintetizan proteínas destinadas a ser secretadas al exterior de la célula, o bien a ser secuestradas para funcionar en otras membranas celulares o vesículas. En los homogenados celulares, los fragmentos de membranas y los ribosomas asociados constituyen la **fracción microsómica**; los detergentes que desestructuran las membranas liberan estos ribosomas.

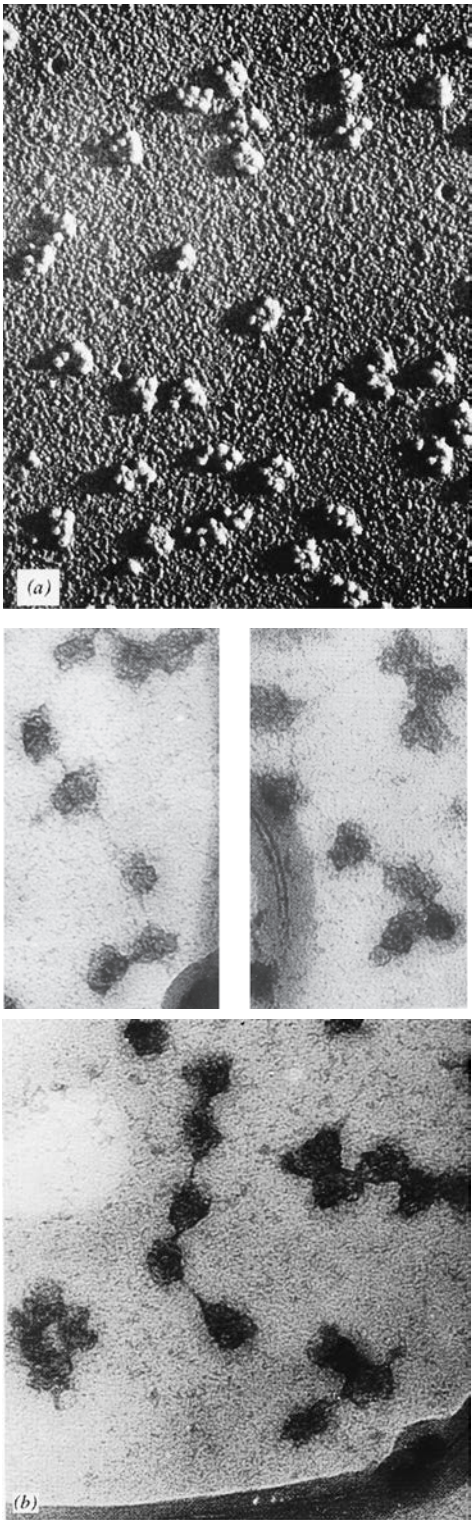


FIGURA 6.6
Micrografías electrónicas de polisomas. (*a*) Los polirribosomas de reticulocito sombreados con platino aparecen como grupos de tres a seis ribosomas, número que está de acuerdo con el tamaño del mRNA de una cadena de globina. (*b*) La tinción con acetato de uranilo y un aumento superior muestra polisomas en los que es visible parte del mRNA.
Cortesia del Dr. Alex Rich, MIT.

6.3 BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La traducción es direccional y colineal con el mRNA

En nuestra lengua, las palabras se leen de izquierda a derecha y no al revés. Análogamente, las secuencias en el RNA mensajero se escriben (y se transcriben) en la dirección 5′ → 3′, y durante la traducción se leen en la misma dirección. Las secuencias de aminoácidos se escriben y se sintetizan desde el residuo amino terminal hacia el carboxilo terminal. Un ribosoma permanece unido a una molécula de mRNA y se mueve a lo largo de su secuencia hasta completar su lectura. La comparación de las secuencias de mRNA con las secuencias de las proteínas que codifican pone de manifiesto una correspondencia perfecta, colineal y sin interrupciones entre la secuencia del mRNA y la del polipéptido sintetizado. (Para una rara excepción, véase la Apli. Clín. 6.4). De hecho, es habitual deducir la secuencia de una proteína a partir de la secuencia nucleotídica del mRNA o del DNA del gen que la codifica. Sin embargo, la secuencia deducida pueden diferir de la proteína real debido a las modificaciones postraducción.

Un proceso puede ser analizado en términos de su inicio, desarrollo, o fase intermedia, y su final. Para la descripción de la traducción seguiremos este esquema: la iniciación del proceso, la elongación, durante la cual se sintetiza la proteína, y la terminación de la síntesis y la liberación del polipéptido una vez completado. A continuación, examinaremos la modificaciones postraducción que puede experimentar una proteína.

La iniciación de la síntesis de proteínas es un proceso complejo

La iniciación requiere la asociación de la subunidad pequeña del ribosoma (40S), un mRNA y el aminoácido *N*-terminal en forma de complejo con el tRNA, y todos en la orientación adecuada. A esta etapa sigue la asociación de la subunidad grande (60S) para formar el complejo de iniciación completo sobre un ribosoma 80S. Este proceso requiere la participación de un complejo grupo de proteínas denominadas **factores de iniciación,** que participan sólo en la iniciación. No se trata de proteínas ribosómicas, aunque se unen transitoriamente a los ribosomas. Existen un gran número de factores de iniciación eucarióticos, y las funciones específicas de algunos de ellos todavía son desconocidas. La síntesis proteica en los procariotas proporciona un modelo menos complejo para establecer comparaciones.

La iniciación de la traducción se muestra en la Figura 6.7. En el primer paso, el **factor de iniciación eucariótico 2a (eIF-2a)** se une al GTP y a una especie **iniciadora** de $tRNA^{met}$, designada como **Met-$tRNA_i^{met}$**, para formar un complejo ternario. Ningún otro aminoacil-tRNA, incluido el Met-$tRNA_e^{met}$, que sólo participa en las etapas de elongación de la síntesis proteica, puede remplazar al Met-$tRNA_i^{met}$ específico de iniciación en esta etapa. Los procariotas también utilizan un tRNA iniciador específico cuya metionina está modificada por formilación de su grupo amino. Sólo el **fMet-$tRNA_i^{met}$** es reconocido por el IF-2 procariótico.

El segundo paso de la iniciación requiere la participación de subunidades ribosómicas 40S, asociadas con la muy compleja proteína eIF-3. La proteína eIF-3 de mamíferos está compuesta por ocho polipéptidos distintos, y tiene una masa de 600–650 kDa. El eIF-3 se une a la subunidad 40S sobre la superficie que contacta con la subunidad 60S, bloqueando físicamente la asociación de las subunidades. El eIF-3 también recibe el nombre de **factor anti-asociación ribosómico**, como lo es también el eIF-6, que interacciona con la subunidad 60S. A partir de este momento se forma un complejo, que incluye el eIF-2a-Met-$tRNA_i^{met}$-GTP, el eIF-3-40S y factores proteicos adicionales, que se une al mRNA, que también se halla unido a varias proteínas. El factor **eIF-4g** es el núcleo del complejo del mRNA; se une al mRNA, a la proteína **eIF-4e**, también conocida como **proteína de unión al casquete, eIF4a**, que se une al mRNA, impidiendo la formación de estructura secundaria, y a una proteína de unión a poliA que que forma un bucle, que acerca el extremo 3' del mensajero al casquete en 5'. Se forma así un complejo que consta de varios factores proteicos, de la subunidad 40S correctamente orientada, el tRNA iniciador y el mensaje. El **complejo final de preiniciación** se forma cuando el mensaje es "barrido" desde el extremo del casquete hasta alcanzar una secuencia AUG de iniciación. Normalmente se usa el primer triplete AUG del mRNA, pero a veces los nucleótidos que la rodean o la estructura secundaria circundante no es apropiada para la iniciación y se selecciona un AUG posterior.

La formación del complejo de iniciación completo prosigue con la implicación de la subunidad 60S y un factor adicional, el eIF-5. La proteína **eIF-5** interacciona primero con el complejo de preiniciación. El GTP es hidrolizado a GDP y P_i, y el eIF-2a-GDP, el eIF-3 y otros factores son liberados. El complejo 40S-Met-$tRNA_i^{met}$-mRNA puede ahora interaccionar con una subunidad 60S y el factor de iniciación eIF-4d para generar un ribosoma 80S con el mensajero y el tRNA iniciador situados correctamente sobre el ribosoma. El eIF-2a-GDP que es liberado interacciona con el **factor de intercambio de nucleótidos de guanina eIF-2b** y con GTP para regenerar eIF-2a-GTP para otra ronda de iniciación.

Los procariotas utilizan un número menor de factores no ribosómicos para formar un complejo de iniciación similar. En primer lugar, las subunidades 30S, unidas a un IF-3 más simple pueden unirse tanto al mRNA como a un complejo ternario de IF-2, fMet-$tRNA_i^{met}$ y GTP. La correcta orientación del mensajero depende en parte del apareamiento entre una secuencia de 8 nucleótidos rica en pirimidinas perteneciente al rRNA 16S y una secuencia rica en purinas, situada unos 10 nucleótidos del lado 5′ del codón de iniciación. La complementariedad entre el rRNA y la secuencia de posicionamiento del mRNA puede no ser perfecta, e incluir varias bases mal apareadas, pero, en primera aproximación, cuanto mayor sea la complementariedad, más eficiente será la iniciación. Es interesante señalar que los eucariotas no utilizan un mecanismo basado en el apareamiento RNA–RNA, sino que en su lugar emplean un gran número de factores proteicos para el posicionamiento correcto del mRNA. Un tercer factor de iniciación, IF-1, también participa en la formación del complejo de preiniciación. Al llegar a este punto, se une la subunidad 50S, el GTP es hidrolizado a GDP y P_i y los factores de iniciación son liberados.

La elongación es el proceso de formación secuencial de enlaces peptídicos

La síntesis de proteínas tiene lugar a través del alargamiento secuencial de la cadena polipeptídica. En cada paso la **peptidil transferasa** ribosómica transfiere el péptido en crecimiento (o en el primer paso, el residuo de metionina inicial) desde su tRNA transportador hasta el grupo α-amino del aminoácido que forma parte del aminoacil-tRNA especificado por el siguiente codón. La eficiencia y la fidelidad se ven favorecidas por la participación de proteínas no ribosómicas, denominadas **factores de elon-**

gación, que utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis del GTP para asegurar la selección de la especie adecuada de aminoacil-tRNA y para desplazar el mensajero y los tRNA asociados a través de la **región descodificadora** de los ribosomas. La elongación se ilustra en la Figura 6.8.

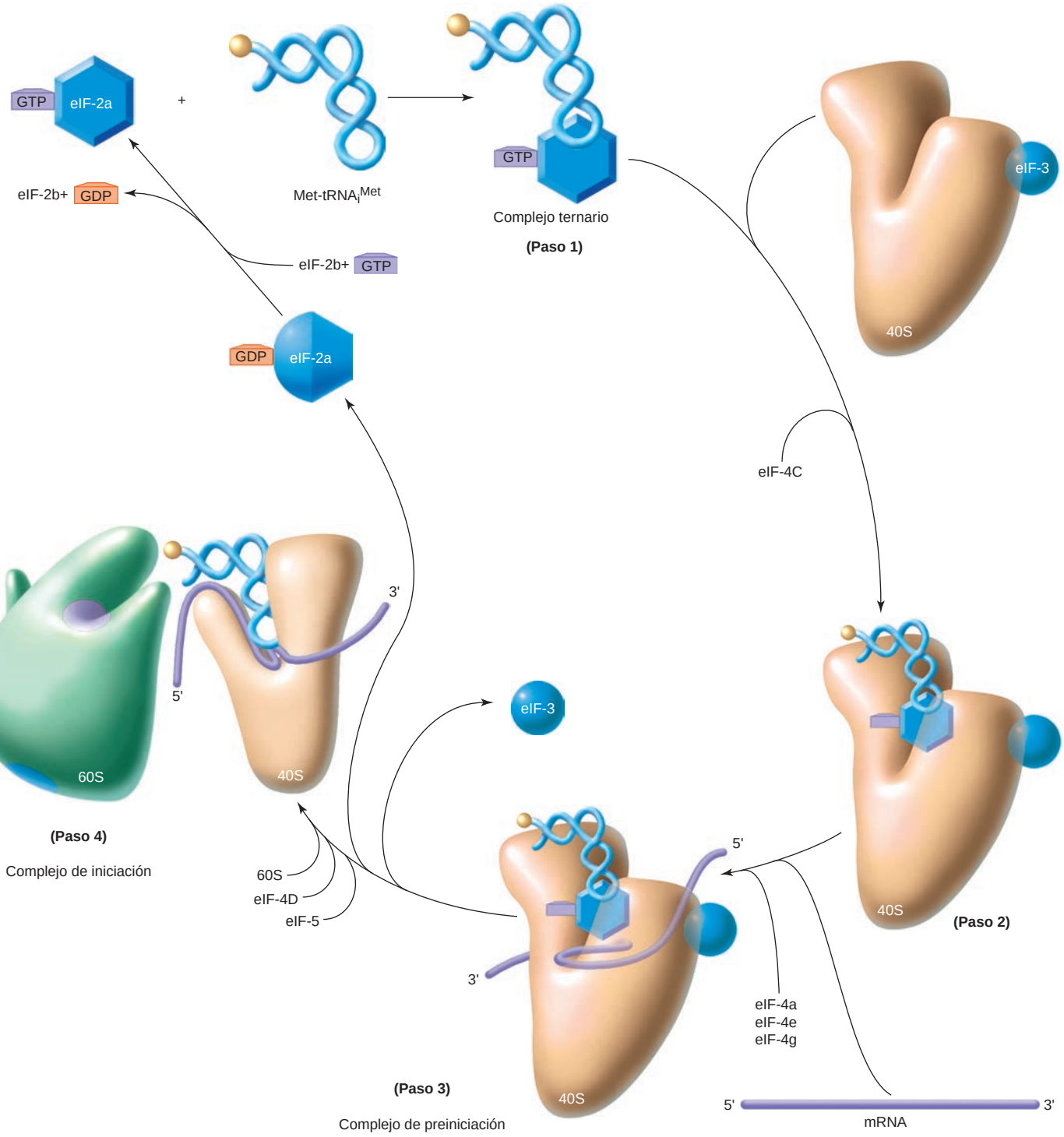
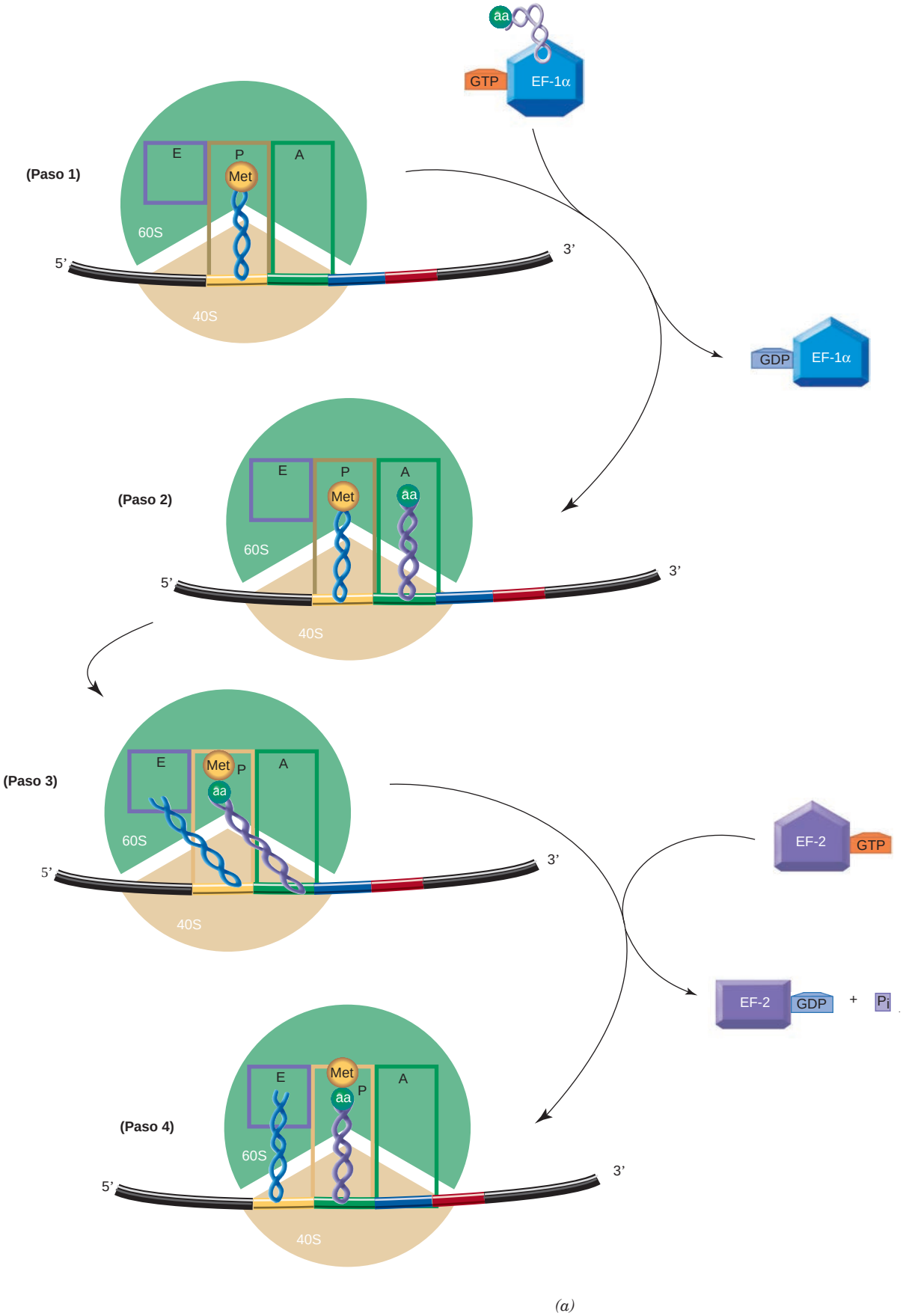
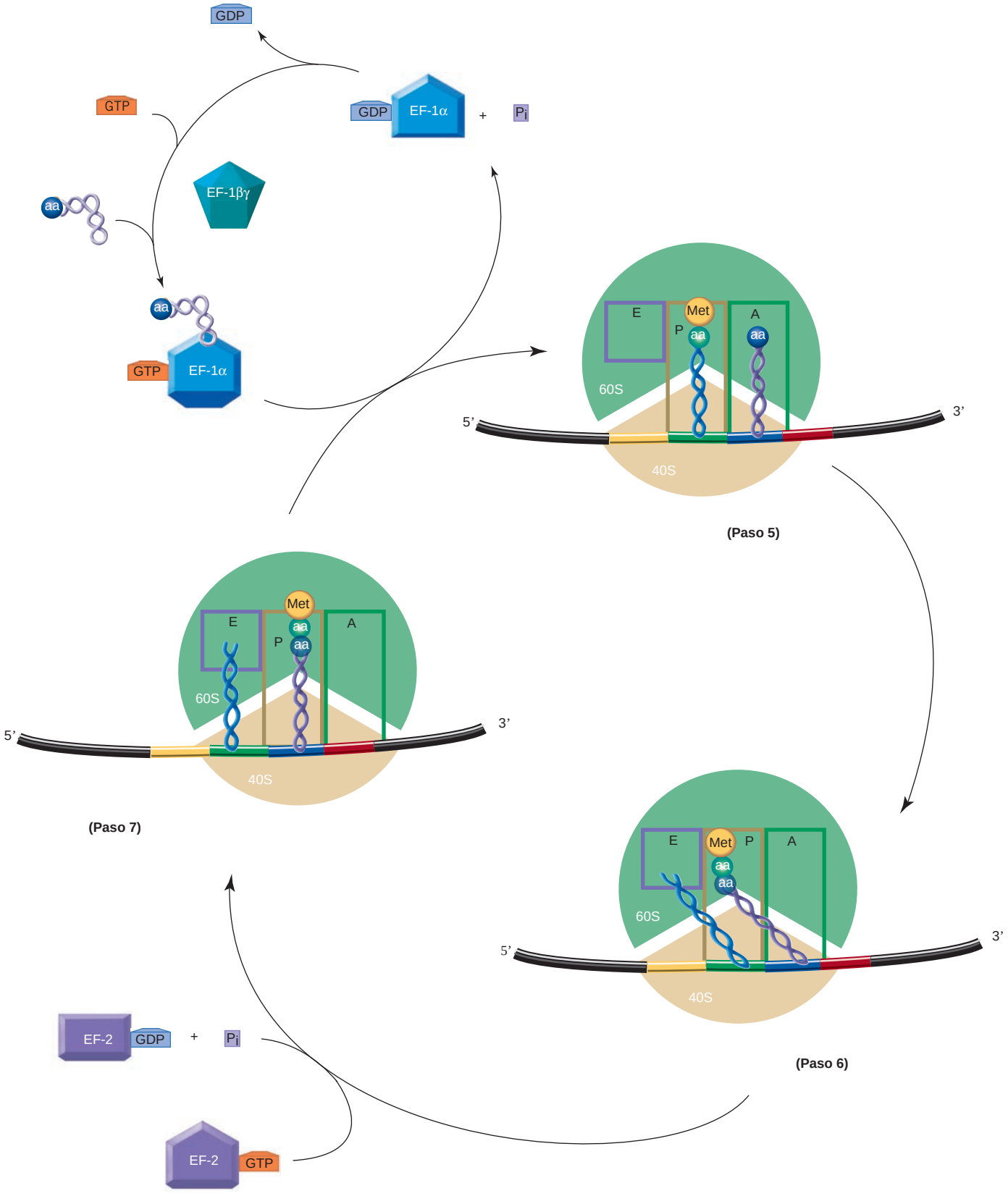


FIGURA 6.7
Iniciación de la traducción en eucariotas.
El proceso se describe en el texto. Un complejo ternario (paso 1) se combina primero con la subunidad ribosómica pequeña para colocar el tRNA iniciador (paso 2). A continuación, la interacción con el mRNA forma un complejo de preiniciación (paso 3). La unión de la subunidad grande completa la formación del complejo de iniciación (paso 4). La distinta forma del eIF-2a en los complejos con GTP y GDP indica el cambio conformacional que tiene lugar en la proteína tras la hidrólisis del trifosfato. Una vez iniciada la elongación, subunidades pequeñas adicionales se unen al mismo mRNA a medida que se forman los polisomas.



(a)

FIGURA 6.8
Pasos de la elongación en la síntesis de proteica eucariótica.
(*a*) Se muestra el primer ciclo de elongación. Paso 1: complejo de iniciación completo con el metionil $tRNA_i^{met}$ en el sitio P del 80S. Paso 2: se coloca un aminoacil tRNA en el sitio A ribosómico con la participación de EF-1α. La hidrólisis de GTP propicia el cambio de conformación de EF-1α. Paso 3: se ha formado el primer enlace peptídico, el nuevo peptidil-tRNA ocupa un sitio híbrido A/P en el ribosoma y el



(b)

brazo aceptor desacilado del $tRNA_i^{met}$ es desplazado al sitio E de la subunidad grande. Paso 4: el complejo mRNA–peptidil-tRNA se ha trasladado completamente al sitio P, mientras que el tRNA iniciador desacilado se ha movido al sitio E. (*b*) Se ilustran rondas de elongación sucesivas. Paso 5: La unión del aminoacil-tRNA causa la liberación concomitante del tRNA desacilado del sitio E. Paso 6: La formación del siguiente enlace peptídico produce una nueva ocupación del sitio híbrido A/P del ribosoma por parte de un nuevo peptidil RNA. Paso 7: la translocación coloca el mRNA y el nuevo peptidil-tRNA en registro en el sitio P. Se pueden añadir sucesivos aminoácidos mediante nuevas repeticiones del ciclo. Para más detalles, véase el texto.

Durante la traducción, hasta 3 moléculas distintas de tRNA pueden estar unidas a lugares específicos que abarcan la dos subunidades del ribosoma. El metionil-tRNA iniciador se sitúa de forma que el residuo de metionina pueda ser transferido (o donado) al grupo α-amino libre del aminoacil-tRNA entrante; ocupa, por tanto, el **sitio dador**, también llamado **sitio peptidilo** o **sitio P** del ribosoma. El aminoacil-tRNA especificado por el codón siguiente del mensaje se encuentra unido al **sitio aceptor**, también denominado **sitio aminoacilo** o **sitio A** del ribosoma. La selección del aminoacil-tRNA correcto está favorecida por la acción del **factor de elongación 1 (EF-1)**; un componente de este factor, el EF-1α, forma inicialmente un complejo ternario con el aminoacil-tRNA y el GTP. El complejo EF-1α-aminoacil-tRNA-GTP se une al ribosoma, y si las interacciones codón–anticodón son correctas, el aminoacil-tRNA se sitúa en el sitio A, el GTP es hidrolizado a GDP y P_i, y el complejo **EF-1α**-GDP se disocia. En este momento, el metionil-tRNA iniciador y el aminoacil-tRNA entrante se yuxtaponen en el ribosoma. Sus anticodones se aparean con codones sucesivos del mensajero en la región descodificadora de la subunidad pequeña, y sus aminoácidos se sitúan uno al lado del otro en el sitio de la peptidil transferasa de la subunidad grande. En este momento tiene lugar la formación del enlace peptídico. La peptidil transferasa cataliza el ataque del grupo α-amino del aminoacil-tRNA sobre el carbono carbonilo del metionil-tRNA. Como resultado, la metionina es transferida al grupo amino del aminoacil-tRNA, que ocupa una posición "híbrida" en el ribosoma. El anticodón permanece en el sitio A de la subunidad 40S, mientras que el extremo aceptor y el péptido unido están en el sito P de la subunidad 60S. El anticodón del tRNA desacilado permanece en el sitio P de la subunidad 40S y su extremo aceptor está localizado en el sitio de **salida** o **sitio E** de la subunidad 60S.

A continuación, el mRNA y el dipeptidil-tRNA en el sitio A de la subunidad 40S deben cambiar de posición para permitir que tenga lugar un nuevo ciclo de elongación. Ello corre a cargo del **factor de elongación 2 (EF-2)**, también denominado **translocasa**. El EF-2 desplaza al mensajero y al dipeptidil-tRNA, manteniendo el registro codón–anticodón, desde el sitio A al P. Durante el proceso la hidrólisis de una molécula de GTP a GDP más P_i proporciona la energía para el desplazamiento, y el sitio A es desalojado. Al mismo tiempo, el dipeptidil-tRNA se traslada al sitio P, el tRNA dador desacilado (metionina) se desplaza hacia el sitio E del ribosoma, que sólo existe en la subunidad 60S. El ribosoma puede participar ahora en un nuevo ciclo. El siguiente aminoacil-tRNA especificado en el mRNA es llevado al sitio A por el **EF-1α**, y el tRNA desacilado que ocupa el sitio E es probablemente liberado. A continuación, se repite la transferencia del péptido. Ciclos sucesivos de unión de aminoacil-tRNA, formación de enlace peptídico, y translocación, dan lugar al alargamiento secuencial del polipéptido hacia el que será su extremo carboxilo. Obsérvese que, independientemente de la longitud de la cadena en crecimiento, la formación del enlace peptídico siempre tiene lugar a través del ataque del grupo α-amino del aminoacil-tRNA entrante sobre el enlace carboxilo-tRNA del péptido, por lo tanto, la disposición geométrica de las moléculas reactivas en el sitio de la peptidil transferasa permanece constante.

La formación del enlace peptídico no requiere una fuente de energía adicional, como por ejemplo ATP o GTP. La energía del enlace éster entre el metionilo (o peptidilo) y el tRNA es suficiente para desplazar la reacción hacia la formación del enlace peptídico; recuérdese que en la biosíntesis de los aminoacil-tRNA se emplea ATP, y que estas reacciones son reversibles. Las subunidades 60S aisladas pueden catalizar la actividad peptidil transferasa sin la colaboración de factores no ribosómicos. La actividad peptidil transferasa no ha podido ser disociada nunca de la subunidad grande o identificada en una proteína ribosómica específica. Un conjunto de datos cada vez más abundantes indica que la subunidad grande es un complejo **ribozima**, en el cual la formación del enlace peptídico es una reacción **catalizada por RNA**. Los experimentos con RNA aislado conformacionalmente estable de la subunidad grande de una bacteria termófila sugieren que el rRNA es el componente catalítico de la peptidil transferasa, mientras que las proteínas sirven para estabilizar el plegamiento del RNA, pero esta hipótesis es cuestionable y difícil de probar. Sin embargo, la estructura cristalográfica de la subunidad grande muestra que la región transferasa está compuesta enteramente de RNA, con la cadena lateral del aminoácido más cercano a 25 Å de distancia. Además, la mutación de un solo residuo de adenina en el RNA produce la pérdida de la actividad transferasa. Por tanto, la reacción central en la formación de las proteínas es casi seguro que está catalizada por RNA. Se ha especulado que el ribosoma primordial fuese una molécula de RNA desnudo.

Tal como se ha determinado en sus equivalentes procarióticos, el papel del GTP en la acción de los factores EF-1α y EF-2 está posiblemente relacionado con cambios conformacionales en estas proteínas. Estudios cristalográficos han demostrado la existencia de grandes reordenamientos de dominios, con movimientos de varios angstroms, durante la hidrólisis del GTP en el **EF-Tu**, el equivalente procariótico del EF-1α. Tanto EF-1α como EF-2 interaccionan fuertemente con los ribosomas cuando forman complejos con el GTP, mientras que los complejos con GDP se disocian mucho más fácilmente del ribosoma. Visto de otra manera, el GTP estabiliza una conformación proteica que confiere a EF-1α una alta afinidad por el aminoacil-tRNA y el ribosoma, mientras que el GDP estabiliza una conformación con una afinidad menor por los mismos, permitiendo así la liberación del tRNA y la disociación de los factores. La recuperación de la conformación de alta afinidad asociada a GTP del EF-1α requiere la participación de **EF-1$\beta\gamma$** (Figura 6.9). Esta proteína desplaza el GDP del EF-1α, formando un complejo EF-1α-EF-1$\beta\gamma$. Seguidamente, el GTP desplaza al EF-1$\beta\gamma$, formándose un complejo EF-1α-GTP, el cual puede unirse sucesivamente al aminoacil-tRNA y al ribosoma. Los procariotas usan un mecanismo similar en el cual el EF-Tu se une al GTP y al aminoacil-tRNA y el **EF-Ts** desplaza al GDP y ayuda a reciclar la molécula transportadora. Los procariotas también utilizan una translocasa dependiente de GTP, equivalente al EF-2, pero denominada **EF-G** o **factor G**.

La terminación de la síntesis de polipéptidos requiere un codón de terminación

La presencia de un codón de terminación UAG, UAA o UGA en el sitio A del ribosoma no promueve la unión de ningún otro tRNA. En su lugar, otra proteína no ribosómica, el **factor de liberación** (**eRF**) interacciona con el ribosoma, en forma de complejo eRF-GTP (Figura 6.10). La peptidil transferasa, actuando en este caso como una hidrolasa, rompe el enlace éster entre el péptido y el tRNA y el polipéptido acabado se separa de su tRNA transportador y del ribosoma. La disociación del eRF del ribosoma, requiere la hidrólisis del GTP unido, y permite la disociación del ribosoma en sus subunidades y su incorporación a un nuevo ciclo de síntesis en la etapa de iniciación. El análisis estructural de los factores de liberación pone de manifiesto una gran similitud estructural con el tRNA; el eRF humano tiene un tamaño y una forma similares al tRNA, y los aminoácidos del extremo del dominio proteico reconocen e interaccionan con un codón de terminación. Este fenómeno de "**mimetismo molecular**" se observa también en el EF-G bacteriano, en el cual un dominio proteico mimetiza al tallo del anticodón del tRNA, y actúa en la elongación mediante el desplazamiento del tRNA del subsitio A al P en subunidad pequeña.

La traducción tiene un alto coste energético

Para sintetizar un polipéptido se usa una cantidad considerable de energía. La activación del aminoácido convierte un ATP en AMP y pirofosfato, que se hidroliza normalmente a P_i; el coste neto son dos enlaces de alta energía. Otros dos enlaces de alta energía se hidrolizan por la acción del EF-1α y el EF-2, lo que hace un total de cuatro por enlace peptídico. Las modificaciones postraducción pueden aumentar el coste energético y, por supuesto, también hay que tener en cuenta la energía necesaria para la biosíntesis de mRNA, tRNA, ribosomas y factores proteicos, aunque estos costes están distribuidos entre todas las proteínas formadas durante su período de existencia.

La síntesis proteica en la mitocondria difiere ligeramente de la síntesis citoplasmática

Muchas de las características de las mitocondrias sugieren que son descendientes de procariotas aerobios que invadieron y establecieron una relación simbiótica con una célula eucariótica. Las mitocondrias han retenido parte de su independencia y carácter procariótico. Las mitocondrias humanas tienen un genoma de DNA circular de 16 569 pares de bases que codifica 13 proteínas, 22 especies de tRNA y dos tipos de rRNA específicos de la mitocondria. Las mitocondrias poseen su propio aparato para la síntesis proteica, que incluye RNA polimerasa, aminoacil-tRNA sintetasas, tRNA y ribosomas. A pesar de que el proceso general de biosíntesis de proteínas en las mitocondrias es similar al descrito en el citosol, algunos aspectos son distintos. Los componentes sintéticos, tRNA, aminoacil-tRNA sintetasas y ribosomas, son específicos de la mitocondria. El número de especies de tRNA es pequeño, y el có-

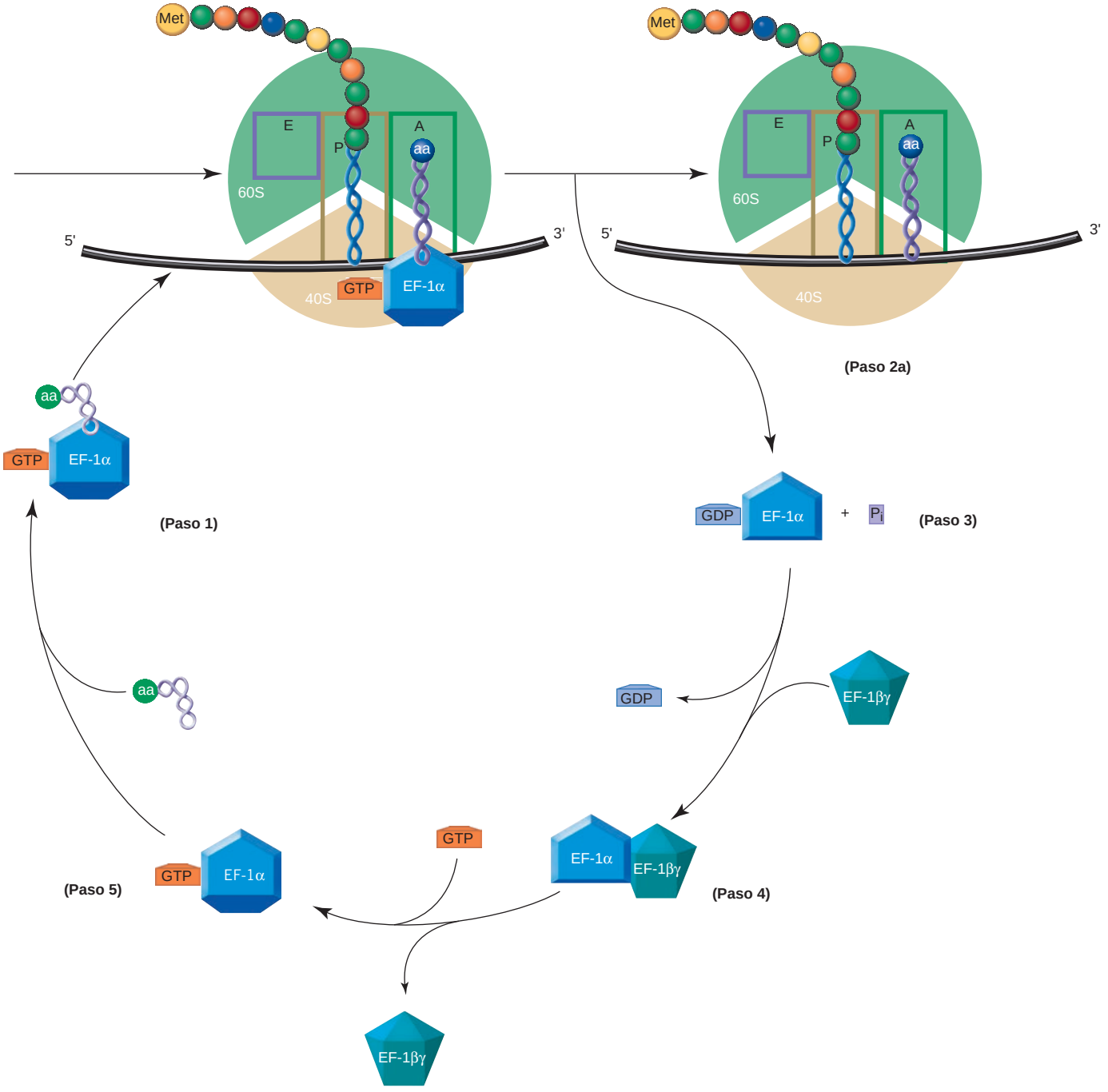


FIGURA 6.9
Acción del factor EF-1 en el ciclo de elongación.

Paso1: El complejo EF-1α-GTP-aminoacil-tRNA se une al ribosoma. Paso 2: El aminoacil-tRNA se coloca sobre el ribosoma (2a) y con hidrólisis concomitante de GTP y un cambio en la conformación del EF-1α (3) que reduce su afinidad por el tRNA y el ribosoma. Paso 4: El GDP es desplazado del EF-1α por el EF-1$\beta\gamma$. La unión del GTP desplaza al EF-1$\beta\gamma$ (paso 5) y permite la unión de un aminoacil-tRNA al EF-1α, en su conformación de alta afinidad (1). En los procariotas existe un ciclo similar; EF-Tu actúa como transportador de un aminoacil-tRNA y el EF-Ts es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina.

digo genético es ligeramente distinto (Tabla 6.2). El tamaño de los ribosomas mitocondriales es menor, y los rRNA son más cortos que los que se encuentran en el citosol de eucariotas y procariotas (Tabla 6.7). Un Met-tRNA$_i^{met}$ iniciador es modificado por una **transformilasa** que utiliza N^{10}-formil H$_4$-folato para producir **fMet-tRNA$_i^{met}$**. La mayor parte de las proteínas mitocondriales están codificadas en el DNA nuclear y son sintetizadas en el citosol; no obstante, las proteínas sintetizadas

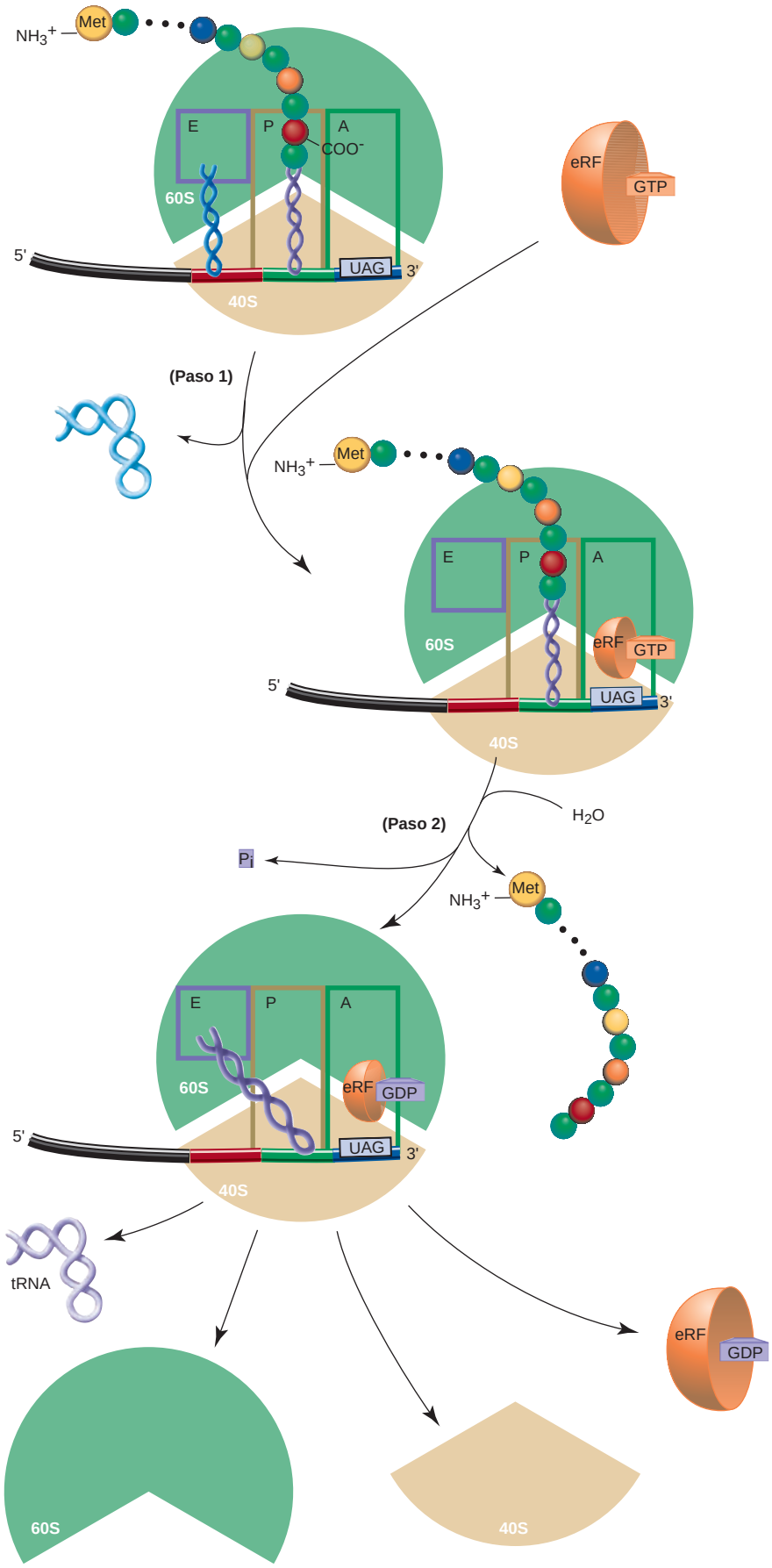
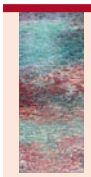


FIGURA 6.10
Terminación de la biosíntesis de proteínas. Cuando un codón de terminación (UAG, UAA o UGA) del mRNA ocupa el sitio A del ribosoma, tiene lugar la unión del complejo GTP–factor de liberación (paso 1), acompañada de la liberación del tRNA desacilado. Paso 2: la peptidil transferasa funciona como una hidrolasa; la proteína se libera por hidrólisis del enlace éster que la une al tRNA y el extremo aceptor del tRNA desacilado probablemente es desplazado. El GTP es hidrolizado a GDP y P_i, lo que presumiblemente altera la conformación del factor del liberación. Los componentes disociados del complejo pueden participar en nuevos ciclos de síntesis proteica.



APLICACIÓN CLÍNICA 6.5

La mutación del RNA ribosómico mitocondrial causa la sordera inducida por antibióticos

En algunas regiones de China existe un porcentaje significativo de casos de sordera que han sido asociados al uso de antibióticos del tipo aminoglucósido como la estreptomicina y la gentamicina en cantidades normalmente seguras y efectivas. Esta sensibilidad poco frecuente a los aminoglucósidos se transmite sólo a través de las mujeres. Esta transmisión materna sugiere la implicación de un locus mitocondrial, ya que el esperma no aporta mitocondrias al zigoto. Los aminoglucósidos actúan normalmente sobre los ribosomas bacterianos, por tanto el ribosoma mitocondrial es un buen lugar para empezar a buscar la mutación.

Una sola mutación puntual A → G en el nucleótido 1555 del gen del DNA mitocondrial del rRNA de la subunidad grande del ribosoma ha sido identificada en familias con esta susceptibilidad a los aminoglucósidos. El sitio de la mutación está en una región altamente conservada de la secuencia del rRNA conocida por su implicación en la unión de aminoglucósidos; algunas mutaciones en la misma región confieren resistencia a los antibióticos, y esta región del RNA forma parte del sitio A ribosómico. Se ha sugerido la hipótesis de que esta mutación hace que la región sea más "parecida a los procariotas", incrementando su afinidad por los aminoglucósidos y la capacidad de que estos antibióticos interfieran en la síntesis proteica en las mitocondrias. Las proteínas que sintetiza la mitocondria son necesarias para la formación de los complejos enzimáticos del sistema de la fosforilación oxidativa, por lo que las células afectadas carecen de ATP. Los aminoglucósidos se acumulan en la cóclea, convirtiéndola en una diana particularmente sensible y acaban provocando sordera sensorioneural. Una sola mutación de cambio de sentido en el gen (*DPP*), que codifica una proteína implicada en el trasporte a través de la membrana en las mitocondrias, también provoca sordera.

Fischel-Ghodsian, N., Prezant, T., Bu, X. y Öztas, S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *Am. J. Otolaryngol.* 14:399, 1993; Prezant, T., et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genet.* 4:289, 1993; y Trannebjaerg, L., Hamel, B. C., Gabreels, F. J., Renier, W. O. y Van Ghelue, M. A *de novo* missense mutation in a critical domain of the X-linked DPP gene causes the typical deafness–dystonia–optic atrophy syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 8:464, 2000.

en las mitocondrias son fundamentales (véase Apli. Clín. 6.5). Las células deben coordinar la síntesis de proteínas en las mitocondrias con la síntesis citosólica de proteínas cuyo destino es ser importadas por la mitocondria.

Algunos antibióticos y toxinas inhiben la biosíntesis de proteínas

La biosíntesis de proteínas es básica para la existencia y la reproducción de las células. Un organismo puede sacar ventaja biológica interfiriendo en la síntesis de proteínas de sus competidores, y muchos antibióticos y toxinas actúan de esta forma. Algunos actúan selectivamente en la síntesis proteica procariótica, lo que los hace extremadamente útiles en la práctica clínica. En la Tabla 6.8 se dan algunos ejemplos de la acción de los antibióticos.

Los antibióticos utilizan diferentes mecanismos para interferir en la interacción del tRNA y las subunidades de los ribosomas. La **estreptomicina** se une a la subunidad pequeña de los ribosomas procarióticos, interfiere con el inicio de la síntesis proteica y causa errores en la lectura del mRNA. Las mutaciones de una proteína ribosómica o del rRNA de la subunidad pequeña pueden conferir resistencia o incluso dependencia de la estreptomicina. La estreptomicina altera las interacciones del tRNA con la subunidad ribosómica y el mRNA, probablemente al afectar la flexibilidad y la conformación de la subunidad. Otros antibióticos aminoglucósidos, como las **neomicinas** y **gentamicinas**, también provocan errores en la traducción; interaccionan con la subunidad pequeña del ribosoma, si bien en sitios distintos de

TABLA 6.8 Algunos inhibidores de la biosíntesis de proteínas

Inhibidor	*Proceso afectado*	*Sitio de acción*
Estreptomicina	Iniciación y elongación	Procariotas: subunidad 30S
Neomicinas	Traducción	Procariotas: múltiples sitios
Tetraciclinas	Unión del aminoacil-tRNA	Subunidades 30S o 40S
Puromicina	Transferencia de péptidos	Ribosomas 70S u 80S
Eritromicina	Translocación	Procariotas: subunidad 50S
Ácido fusídico	Translocación	Procariotas: EF-G
Cicloheximida	Elongación	Eucariotas: ribosomas 80S
Ricina	Múltiples	Eukaryotes: 60S subunit

los de la estreptomicina. La **kasugamicina** inhibe la iniciación de la traducción. La sensibilidad a la kasugamicina depende de la metilación, normalmente presente, de dos adeninas adyacentes en el rRNA de la subunidad pequeña. Las **tretraciclinas** se unen a los ribosomas e interfieren en la unión de los aminoacil-tRNA.

Otros antibióticos intervienen con la elongación. La **puromicina** (Figura 6.11) se parece a un aminoacil-tRNA; se une al sitio A de la subunidad grande y actúa como aceptor en la reacción de la peptidil transferasa. Sin embargo, puesto que su derivado aminoacilo no se encuentra unido al nucleósido mediante un enlace éster, no puede actúar de dador en la formación del enlace peptídico. Por tanto, la puromicina provoca la terminación prematura de la traducción con liberación de peptidil-puromicina. El **cloranfenicol** inhibe a la peptidil transferasa uniéndose al centro activo; no se produce la transferencia, y el peptidil-tRNA permanece unido al ribosoma.

La etapa de translocación constituye también una diana potencial. El antibiótico macrólido **eritromicina** interfiere con la translocación en los ribosomas procarióticos. La translocación eucariótica es inhibida por la **toxina diftérica**, una proteína producida por *Corynebacterium diphtheriae*; la toxina se une a la membrana celular, y una subunidad penetra en el citoplasma y cataliza la ADP-ribosilación e inactivación del EF-2, tal como muestra la reacción

$$\underset{\text{(activo)}}{\text{EF-2}} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{ADP-ribosil}\ \underset{\text{(inactivo)}}{\text{EF-2}} + \text{nicotinamida} + \text{H}^+$$

La unión de la fracción ADP-ribosa al EF-2 se efectúa en un residuo de **diftamida**, que es una histidina modificada postraducción. Las modificaciones postraducción se tratan en la próxima sección.

Un tercer grupo de toxinas ataca al rRNA. La **ricina** (del ricino) y varias toxinas relacionadas son *N*-glucosidasas que cortan una única adenina en el rRNA de la subunidad grande. El ribosoma se inactiva por este daño aparentemente menor. Una toxina fúngica, la ***α*-sarcina**, corta el rRNA de la subunidad grande en un único punto y también inactiva al ribosoma. Algunas cepas de *E. coli* atacan a otras bacterias mediante la producción de toxinas extracelulares, como la **colicina E3**, una ribonucleasa que corta el RNA 16S en un punto cercano a la secuencia de unión al mensajero y a la región de descodificación; de esta forma inactivan las subunidades pequeñas e interrumpen la síntesis proteica de las células competidoras.

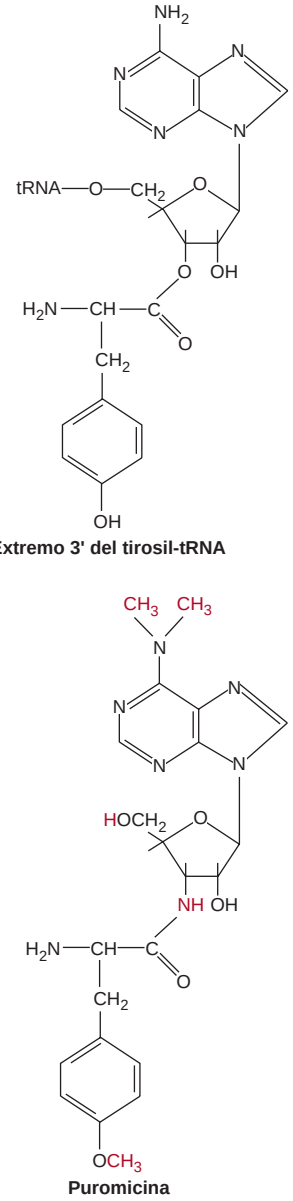


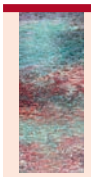
FIGURA 6.11
La puromicina (abajo) interfiere con la síntesis de proteínas actuando como un análogo del aminoacil-tRNA, en este caso tirosil-tRNA (arriba) en la reacción de la peptidil transferasa.

6.4 MADURACIÓN DE LAS PROTEÍNAS: PLEGAMIENTO, MODIFICACIÓN, SECRECIÓN Y DESTINO

Algunas proteínas emergen del ribosoma preparadas para ejercer inmediatamente su función, mientras que otras experimentan una gran variedad de **modificaciones postraducción**. Tales modificaciones pueden dar lugar a la adquisición de la forma funcional, al traslado a un compartimiento subcelular específico, a la secreción al exterior de la célula o a una alteración de la actividad o de la estabilidad. La información que determina el destino postraducción de una proteína reside en su estructura; es decir, la secuencia de aminoácidos y la conformación polipeptídica determinan si una proteína servirá como sustrato para un enzima modificador y/o la identifican para ser trasladada a una localización subcelular o extracelular.

Las chaperonas facilitan el plegamiento de las proteínas

Muchas proteínas pueden adquirir independiente y espontáneamente la correcta conformación tridimensional. Por ejemplo, la ribonucleasa pancreática completamente desnaturalizada puede, en condiciones apropiadas, plegarse, formar los puentes disulfuro correctos y adquirir plena actividad. Las subunidades de los ribosomas bacterianos pueden reconstituirse a partir de RNA desnaturalizado y componentes proteicos. El plegamiento de algunas proteínas celulares puede tener lugar sin ayuda, pero muchas proteínas sólo adquieren la conformación correcta con la asistencia de una o más proteínas **chaperona**. Un subgrupo de chaperonas, las **chaperoninas**, son estructuras tubulares formadas por muchos componentes que requieren ATP. Las chaperonas se unen reversiblemente a regiones hidrofóbicas de las proteínas desplegadas y a los intermediarios de plegamiento. Pueden estabilizar intermediarios,



APLICACIÓN CLÍNICA 6.6

Deleción de un codón, modificación postraducción incorrecta y degradación proteica prematura: fibrosis quística

La fibrosis quística (CF) es la enfermedad autosómica recesiva más común entre los caucásicos, con una frecuencia de un 1 por 2000. El gen de la CF tiene 230 kb de longitud y contiene 27 exones que codifican una proteína de 1480 aminoácidos. La proteína, conocida con el nombre de regulador de la conductancia de la membrana de la fibrosis quística o CFTR, es un miembro de una familia de proteínas de transporte dependientes de ATP. Contiene dos dominios transmembrana, dos dominios de unión a nucleótidos que interaccionan con ATP y un dominio regulador que contiene varios sitios de fosforilación. La CFTR funciona como canal de cloruro regulado por AMP cíclico. Los epitelios de la CF se caracterizan por un transporte de electrolitos defectuoso. Los órganos más gravemente afectados son los pulmones, el páncreas y el hígado, y los efectos más peligrosos para la supervicencia son consecuencia de las secreciones mucosas espesas que provocan una obstrucción crónica de los pulmones e infecciones pulmonares persistentes.

En aproximadamente el 70% de los individuos afectados, el problema está causado por una deleción de tres nucleótidos que provoca la deleción de un solo aminoácido, la fenilalanina 508, localizada en el dominio 1 de unión de ATP en el lado citoplasmático de la membrana plasmática. Como ocurre con otras mutaciones de la CF, la proteína con la deleción de la fenilalanina 508 no se pliega correctamente en el RE, y tampoco es correctamente glucosilada y transportada a la superficie de la célula. En su lugar, es devuelta al citoplasma y degradada en los proteasomas.

Ward, C., Omura, S. y Kopito, R. Degradation of CFTR by the ubiquitin–proteasome pathway. *Cell* 83:121, 1995; y Plemper, R. K. y Wolf, D. H. Retrograde protein translocation: eradication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24:266, 1999.

mantener proteínas en estados desplegados para permitir el paso a través de membranas, ayudar a desplegar segmentos plegados incorrectamente, impedir la formación de intermediarios incorrectos e impedir interacciones inadecuadas con otras proteínas. Todas estas actividades pueden contribuir a que la proteína adquiera la conformación funcional, que normalmente será la más compacta. El fracaso en el plegamiento correcto normalmente va seguido de la rápida degradación de la proteína (véase la Apli. Clín. 6.6), y la acumulación de proteínas mal plegadas puede provocar su agregación y enfermedades graves (véase la Apli. Clín. 6.7).

Las proteínas para la exportación siguen la ruta secretora

Las proteínas destinadas a la exportación se sintetizan en ribosomas unidos a la membrana del **retículo endoplasmático rugoso (RER)** (Figura 6.12). La iniciación y la elongación comienzan en los ribosomas libres del citosol. Las proteínas de la ruta secretora tienen un **péptido señal** hidrofóbico, normalmente cerca del extremo amino terminal. No existe una única secuencia señal, pero sus características incluyen una región N-terminal cargada positivamente, un núcleo hidrofóbico de 8–12 aminoácidos seguido de un segmento C-terminal más polar que finalmente sirve de lugar de corte para la escisión del péptido señal.

El péptido señal de 15–30 aminoácidos emerge del ribosoma y se une a una **partícula de reconocimiento de señal (SRP)** citoplasmática (véase la Figura 6.13). La SRP es una partícula alargada compuesta por seis proteínas distintas y una pequeña molécula (7S) de RNA. La unión del péptido señal a una cavidad hidrofóbica de la SRP con el segmento N-terminal cargado positivamente en contacto con el RNA de la SRP orienta al ribosoma y detiene la síntesis de la proteína. El complejo se une al RE, donde la SRP reconoce y se une a un receptor de SRP o "**proteína de anclaje**", localizada en la cara citoplasmática de la membrana del RE. El ribosoma es transferido a un **translocón**, un **receptor ribosómico** que cruza la membrana y sirve de pasillo a través de la membrana. La SRP y la proteína de anclaje se liberan y pueden actuar de nuevo en la conducción de otros ribosomas hacia el RE, el bloqueo impuesto sobre la traducción por la SRP se levanta y el pasillo del translocón se abre y se ensancha para permitir el paso de la proteína naciente. La secuencia señal hidrofóbica, unida probablemente a una proteína receptora, se inserta en la membrana, anclando aún más al ribosoma en el RE. La traducción y la extrusión en o a través de la membrana están acoplados a partir de este momento; incluso segmentos muy hidrofílicos o iónicos son conducidos hacia la luz del RE a través de la membrana. Un sitio de corte es hidrolizado en la proteína por la **peptidasa señal**, una proteína integral de membrana situada en la superficie de la luz del RE. La proteína completa su plegamiento en una estructura tridimensional estable, pueden formarse puentes disulfuro, y también pueden ensamblarse los componentes de proteínas multiméri-

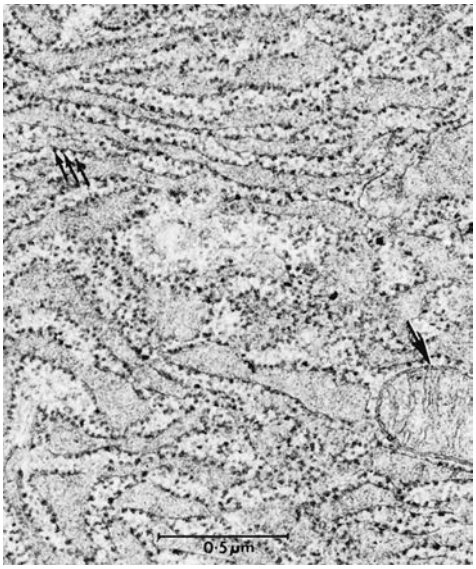
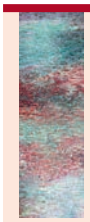


FIGURA 6.12
Retículo endoplasmático rugoso de una célula plasmática.
Las tres flechas paralelas indican tres ribosomas entre los muchos que están unidos a las muy abundantes membranas. La flecha única indica una mitocondria para su comparación.
Cortesía del Dr. U. Jarlfors, University of Miami.



APLICACIÓN CLÍNICA 6.7

Plegamiento defectuoso y agregación: Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de las vacas locas, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington

Las proteínas mal plegadas habitualmente son eliminadas por degradación proteolítica, como ocurre con la proteína mutante CFTR de la fibrosis quística (véase la Apli. Clín. 6.6). Varias enfermedades neurológicas ilustran las consecuencias de la acumulación celular de agregados de proteínas mal plegadas o de sus productos de degradación parcial.

Los priones (agentes infecciosos proteicos) carecen de ácidos nucleicos, pero poseen algunas características de los patógenos víricos o microbianos. La primera enfermedad causada por priones identificada fue el temblor ovino. Las dolencias humanas comprenden el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD) y una forma de CJD derivada de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), popularmente conocida como "enfermedad de las vacas locas" en el ganado. Estas enfermedades difieren en el curso y en la rapidez de su desarrollo, pueden ser heredadas, espontáneas o ser resultado de una infección, pero todas causan neurodegeneración y finalmente la muerte. La autopsia muestra degeneración espongiforme del cerebro y acumulación intracelular de depósitos de placa amiloide en forma de bastón.

La enfermedad resulta de una transición conformacional en una proteína celular normal de 254 residuos, designada por PrP^{C}. La proteína se encuentra sobre todo en la superficie exterior de las neuronas, pero su función es todavía desconocida. Los estudios estructurales muestran que es rica en hélice α y carente de lámina β; es soluble en disoluciones de detergentes suaves y tiene poca tendencia a formar grandes agregados. La forma infecciosa de la proteína priónica, designada por PrP^{Sc}, es rica en lámina β y mucho menos soluble. Un fragmento resistente a las proteasas es probable que agregue y forme placa, y varias mutaciones de la PrP^{C} están implicadas en la formación la PrP^{Sc} infecciosa. La infección se produce por consumo de comida, en especial tejido nervioso, que contenga PrP^{Sc}. El consumo ritual de cerebro humano por los nativos de Nueva Guinea dio lugar a la extensión del kuru y la inclusión de vísceras infectadas en los piensos para animales extendió el temblor ovino y la BSE. Los humanos han adquirido la variante CJD al consumir ternera infectada con la BSE. La PrP^{Sc} actúa alterando la conformación de la PrP^{C} celular normal; aunque el mecanismo es objeto de controversia, parece ser que PrP^{Sc} funciona con o como una chaperona, facilitando la adopción de la conformación PrP^{Sc} por parte de la PrP^{C} existente o recién sintetizada. La forma resistente a las proteasas se acumula junto con fragmentos de proteolisis parcial y forma los agregados característicos de la enfermedad (aunque no son necesariamente la causa de sus síntomas).

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una pérdida progresiva de memoria y de conciencia y es más común en gente de avanzada edad. La enfermedad de Alzheimer no está causada por un prión o por otro agente infeccioso externo, pero también se caracteriza por la acumulación intra y extraneuronal de agregados filamentosos en forma de placas. El componente principal de las placas es el β-amiloide, un péptido de 39-43 aminoácidos derivado de una proteína amiloide precursora de mayor tamaño. Otros componentes de la placa se encuentran altamente ubiquitinados, pero son resistentes a las proteasas en forma fibrosa compacta. La enfermedad de Huntington es una dolencia neurodegenerativa que también está asociada con la acumulación de agregados proteicos. En este caso está implicada una variante de una proteína celular denominada huntingtina; un codón CAG de la proteína se expande en los individuos afectados, causando la aparición de una serie de hasta 180 residuos de poliglutamina. La proteína o los péptidos que de ella se derivan forman inclusiones en el núcleo. Otros desórdenes neurodegenerativos se encuentran también asociados a la expansión de segmentos de poliglutamina y a la deposición de proteína.

Baldwin, M. A., Cohen, F. A. y Prusiner, S. P. Prion protein isoforms, a convergence of biological and structural investigations. *J. Biol. Chem.* 270:19197, 1995; Kaytor, M. D. y Warren, S. T. Aberrant protein deposition and neurological disease. *J. Biol. Chem.* 274:37507, 1999; Selkoe, D. J. Amyloid β-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271:18295, 1996; y Weissmann, C. Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Biol. Chem.* 274:3, 1999.

cas. Otras etapas de maduración pueden incluir la modificación proteolítica y la glucosilación, que tienen lugar en la luz del RE y durante el tránsito de la proteína a través del aparato de Golgi y del interior de vesículas secretoras.

La glucosilación de proteínas tiene lugar en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi

La importancia de la **glucosilación** de proteínas para formar glucoproteínas (véase la p. 129) es doble: en primer lugar, altera las propiedades de las proteínas, cambiando su solubilidad, estabilidad y tamaño físico; en segundo lugar, los grupos glucídicos de las glucoproteínas sirven como señales de reconocimiento esenciales en los procesos de transporte de proteínas y en los mecanismos de reconocimiento celular de otras proteínas o células. La glucosilación de proteínas puede implicar la adición de unos pocos residuos glucídicos, o la formación de grandes cadenas de oligasacáridos ramificados. Los sitios y tipos de glucosilación están determinados por la presencia de aminoácidos y secuencias apropiados de la proteína y por la disponibilidad en la célula de enzimas y sustratos para llevar a cabo las reacciones de glucosilación.

La glucosilación de proteínas se realiza por medio de una gran variedad de **glucosiltransferasas**, algunas de las cuales se recogen en la Tabla 6.9. Hasta un centenar de enzimas distintos pueden catalizar una reacción básicamente similar, en la

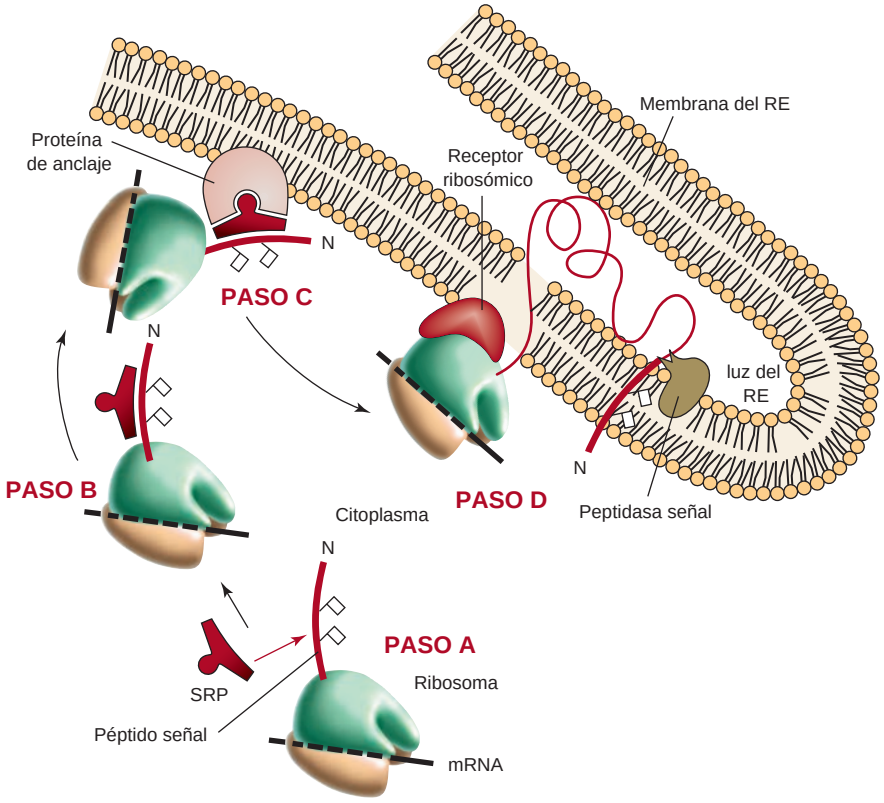


FIGURA 6.13
La ruta secretora: reconocimiento del péptido señal.
Paso A: un péptido señal hidrofóbico surge del sitio de salida de un ribosoma libre que se encuentra en el citosol. Paso B: La partícula de reconocimiento de señal (SRP) se une al péptido y la elongación se detiene temporalmente. Paso C: El ribosoma se desplaza hasta la membrana del retículo endoplasmático, donde la proteína de acoplamiento fija la SRP. Paso D: el ribosoma se transfiere a un translocón, y se reanuda la elongación. La proteína recién sintetizada atraviesa la membrana hacia la luz del RE.

cual un azúcar es transferido desde un sustrato dador activado hasta un aceptor apropiado, generalmente otro residuo de azúcar que forma parte de un oligosacárido en construcción. Los enzimas pueden mostrar tres tipos de especificidad: por el **monosacárido** transferido, por la estructura y secuencia de la molécula **aceptora**, y por el sitio y configuración del **enlace anomérico** formado.

Una clase de glucoproteínas posee azúcares unidos al nitrógeno amida de residuos de asparagina, por un proceso conocido como ***N*-glucosilación**. (El antibiótico **tunicamicina** impide la *N*-glucosilación). La formación de *N*-oligosacáridos empieza en la luz del RE y continúa después del transporte de la proteína al apa-

TABLA 6.9 Glucosiltransferasas de las células eucarióticas

Azúcar transferido	*Abreviatura*	*Dadores*	*Glucosiltransferasas*
Manosa	Man	GDP-Man Dolicol-Man	Manosiltransferasa
Galactosa	Gal	UDP-Gal	Galactosiltransferasa
Glucosa	Glc	UDP-Glc Dolicol-Glc	Glucosiltransferasa
Fucosa	Fuc	GDP-Fuc	Fucosiltransferasa
N-Acetilgalactosamina	GalNAc	UDP-GalNac	*N*-acetilgalactosaminiltransferasa
N-Acetilglucosamina	GlcNAc	UDP-GlcNAc	*N*-acetilglucosaminiltransferasa
Ácido *N*-acetilneuramínico (o ácido siálico)	NANA or NeuNAc SA	CMP-NANA CMP-SA	*N*-Acetilneuraminiltransferasa (sialiltransferasa)

rato de Golgi. Se requiere una secuencia específica de glucosilación, Asn-X-Thr (o Ser), en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina o ácido aspártico. No todas las secuencias Asn-X-Thr/Ser están glucosiladas, ya que algunas de ellas pueden no ser accesibles debido a la conformación de la proteína.

La biosíntesis de los *N*-oligosacáridos usa un intermediario unido a un lípido (Figura 6.14). El **fosfato de dolicol** en la superficie de las membranas del RE sirve como aceptor glucosilo de la *N*-acetilglucosamina. A continuación se procede a la glucosi-

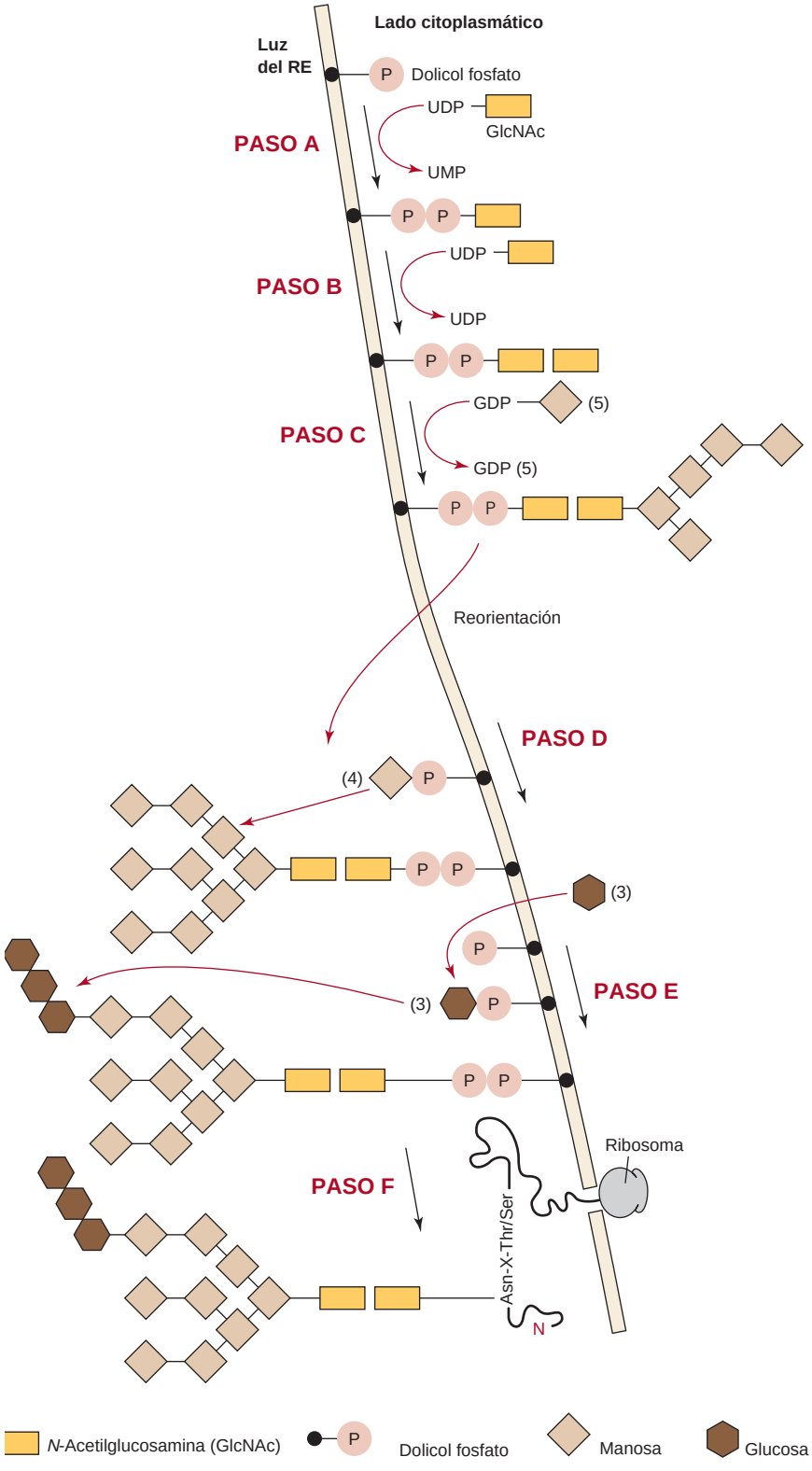


FIGURA 6.14
Biosíntesis de *N*-oligosacáridos en la superficie del retículo endoplasmático. Paso A: La síntesis se inicia en la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplasmático, por transferencia de *N*-acetilglucosamina fosfato a un aceptor dolicol. Paso B: La formación del primer enlace glucosídico tiene lugar junto con la transferencia de un segundo residuo de *N*-acetilglucosamina. Paso C: Se añaden secuencialmente cinco residuos de manosa (desde un transportador GDP-manosa). En este momento, el oligosacárido unido al lípido se reorienta hacia la luz de la membrana. Paso D: Se transfieren residuos de manosa y glucosa (paso E) adicionales desde los intermediarios unidos a dolicol. Los complejos azúcar–dolicol se forman a partir de azúcares nucleósido difosfato citosólicos. Paso F: Finalmente, una vez completado, el oligosacárido se transfiere a una proteína en proceso de síntesis en la superficie de la membrana; llegados a este punto, el péptido señal ya puede haber sido eliminado.

lación secuencial y a la formación de un $(Man)_5(GlcNAc)_2$-pirofosforil-dolicol ramificado en el lado citosólico de la membrana. Tras la **reorientación** de este intermediario hacia la superficie de la luz de la membrana del RE, se añaden secuencialmente cuatro manosas y tres residuos de glucosa adicionales para completar la estructura. Este oligosacárido es transferido desde su transportador dolicol a un residuo de asparagina del polipéptido a medida que éste surge en la luz del retículo endoplasmático. Por tanto, la *N*-glucosilación es **cotraduccional**; es decir, tiene lugar a medida que la proteína es sintetizada, y puede afectar al plegamiento de la proteína.

A continuación, las **glucosidasas** eliminan algunos residuos de azúcar de la estructura recién transferida. Los residuos de glucosa, requeridos para la transferencia del oligosacárido desde su transportador dolicol, son secuencialmente eliminados, así como un residuo de manosa. Estas modificaciones marcan a la glucoproteína completamente plegada para ser transportada hacia el aparato de Golgi, donde otros residuos pueden ser eliminados por las glucosidasas. También pueden añadirse azúcares adicionales por una gran variedad de glucosiltransferasas. Los *N*-oligosacáridos resultantes son diversos, si bien se pueden distinguir dos clases. El tipo **rico en manosa**, que contiene residuos de manosa con una gran variedad de enlaces, y que muestra una menor modificación desde el intermediario unido a dolicol. El **tipo complejo** sufre mayores modificaciones y es más diverso, con una gran variedad de azúcares y enlaces. La Figura 6.15 muestra ejemplos de oligosacáridos maduros.

La segunda clase más importante de glucoproteínas posee azúcares unidos a grupos hidroxilo de serina o treonina (véase p. 131). La serina y la treonina no deben formar parte de una secuencia específica, pero sólo los residuos cuyas cadenas laterales se encuentren en un entorno apropiado sobre la superficie de la proteína podrán actuar de aceptores para la GalNAc-transferasa que une la *N*-acetil galactosamina a la proteína. La ***O*-glucosilación** se da sólo después de que la proteína haya

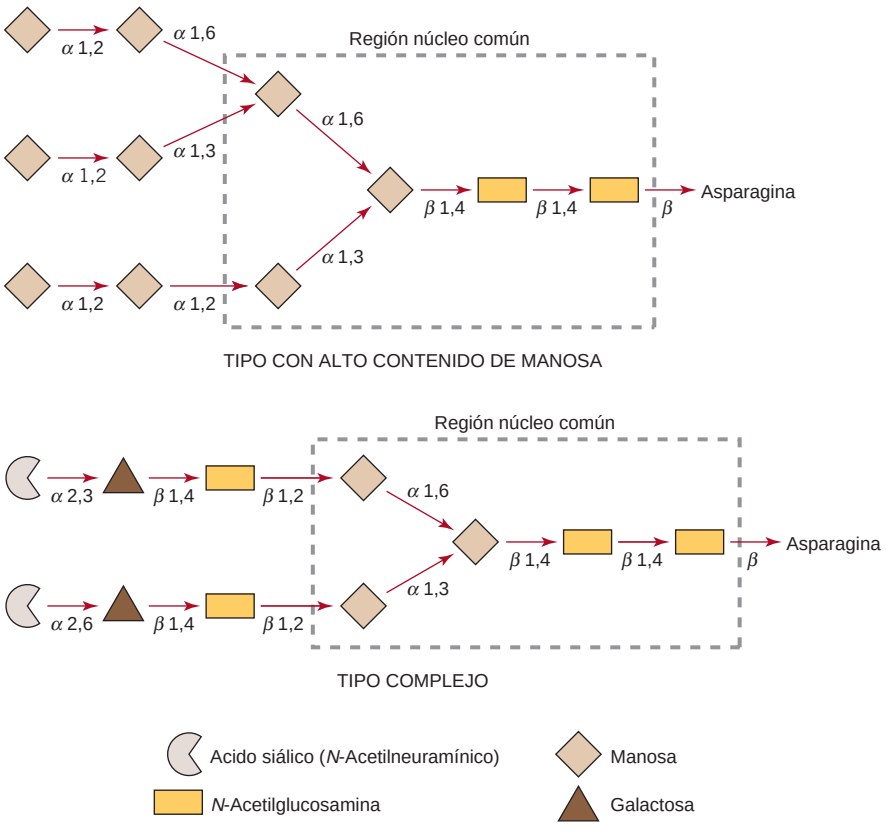


FIGURA 6.15
Estructura de *N*-oligosacáridos.
En la figura se muestran las estructuras básicas de ambos tipos de *N*-oligosacáridos. En ambos casos la estructura proviene del dolicol-oligosacárido inicial, por acción de glucosidasas y glucosiltransferasas. Obsérvese la variedad de enlaces glucosídicos que intervienen en estas estructuras.

alcanzado el aparato de Golgi. Por lo tanto, la *O*-glucosilación es siempre postraducción y ocurre sólo en proteínas completamente plegadas. A continuación tiene lugar la adición secuencial de azúcares al aceptor GalNAc. Las estructuras sintetizadas dependen de los tipos y de las cantidades de glucosiltransferasas en una célula determinada. Si un aceptor es sustrato de más de una transferasa, la cantidad de cada uno de los enzimas controla el grado de competencia entre ellos. Pueden formarse algunos oligosacáridos que no sean aceptores para ninguna de las glucosiltransferasas presentes, en este caso la cadena no podrá proseguir su síntesis. Otras estructuras pueden ser excelentes aceptores, y seguirán creciendo hasta ser completadas por una de las diversas secuencias no aceptoras de terminación. Estos procesos pueden dar lugar a muchos tipos distintos de oligosacáridos sobre proteínas por lo demás idénticas, por tanto la **heterogeneidad** es común en las glucoproteínas. En la Figura 6.16 se muestran algunos ejemplos.

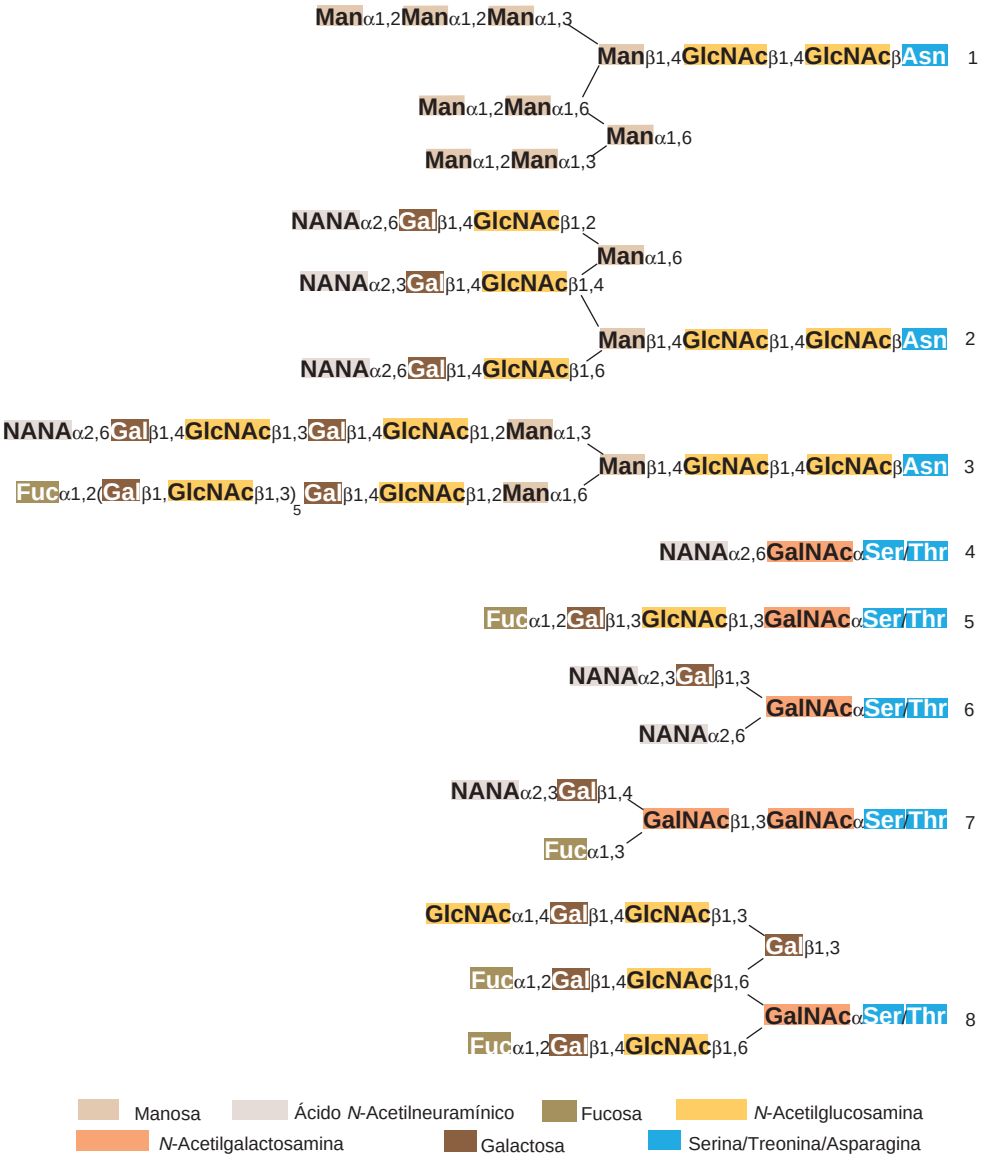


FIGURA 6.16
Ejemplos de estructuras de oligosacáridos.
Las estructuras 1–3 son *N*-oligosacáridos típicos del grupo rico en manosa (1) y de tipo complejo (2 y 3); obsérvese la región núcleo común, que se forma desde el residuo asparagina de la proteína a través del primer punto de ramificación. Las estructuras 4–8 son *O*-oligosacáridos típicos, que pueden ser muy simples o muy complejos. Obsérvese que, si bien la estructura núcleo común (GalNac-Ser/Thr) es distinta de la de los *N*-oligosacáridos, los extremos pueden ser muy similares (p.e., las estructuras 2 y 6, y 3 y 7).
Abreviaturas: Man = manosa; Gal = galactosa; Fuc = fucosa, GlcNAc = *N*-acetilglucosamina; GalNAc = *N*-acetilgalactosamina; NANA = ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico).
Adaptado de Paulson, J. Trends Biochem. Sci. *14:272, 1989.*

6.5 DESTINO A MEMBRANAS Y ORGÁNULOS

El transporte de proteínas desde el RE hacia y a través del aparato de Golgi y más allá utiliza vesículas transportadoras. Sólo las proteínas correctamente plegadas son **aptas** para el transporte y las chaperonas contribuyen en el RE al plegamiento y a la formación de los puentes disulfuro correctos. Las proteínas mal plegadas o dañadas son exportadas al citosol para su degradación. La determinación del destino de las proteínas ocurre a la vez que la glucosilación y el recorte proteolítico durante el paso a través de los elementos *cis*, medial y *trans* del aparato de Golgi. Familias de vesículas de **proteínas receptoras SNARE** suministran la especificidad necesaria para el destino de membrana y la fusión.

La selección de las proteínas destinadas a los lisosomas tiene lugar en la ruta secretora

El proceso de distribución mejor conocido es el responsable del destino de glucoproteínas específicas a los **lisosomas**. En el Golgi *cis* algún elemento estructural hace que las proteínas lisosómicas sean reconocidas por una glucosiltransferasa que une *N*-acetilglucosamina fosfato (GlcNAc-P) a oligosacáridos ricos en manosa. A continuación, una glucosidasa elimina la GlcNAc, generando un oligosacárido que contiene **manosa 6-fosfato** (Figura 6.17), que es responsable de la compartimentación y el transporte vesicular de estas proteínas hasta los lisosomas. Otras cadenas de oligosacárido de las proteínas pueden sufrir modificaciones adicionales para formar estructuras de tipo complejo, pero el destino lisosómico de estas proteínas está determinando por la manosa 6-fosfato. Los pacientes con la **enfermedad de las células I** carecen de GlcNAc-P glucosiltransferasa, y no pueden dirigir correctamente los enzimas lisosómicos, por lo tanto los enzimas son secretados al exterior de la célula (véase la Apli. Clín. 6.8).

Se dispone de un conocimiento aceptable de otras señales de distribución. Las proteínas solubles son retenidas en la luz del RE como respuesta a la presencia en el C-terminal de la secuencia **KDEL** (Lys-Asp-Glu-Leu). Una secuencia distinta en un C-terminal expuesto determina la retención de la proteína en la membrana del RE. Se han identificado dominios transmembrana que causan la retención en el aparato de Golgi. La glucosilación específica de polipéptidos y la sulfatación de algunas hormonas glucoproteicas en la hipófisis anterior determina su envío hacia gránulos de almacenamiento. La modificación por ácido polisiálico de algunas proteínas de adhesión de células neuronales es a la vez un proceso específico de proteína y regulado durante el desarrollo. Quedan aún por descifrar otras muchas señales de distribución para comprender de qué modo el aparato de Golgi dirige las proteínas hacia sus propios subcompartimientos, hacia gránulos de almacenamiento y secreción, o hacia elementos específicos de la membrana plasmática.

La ruta secretora dirige las proteínas hacia los lisosomas, o bien hacia destinos localizados en la membrana plasmática o en el exterior de la célula. El envío de las proteínas hacia el RE y el aparato de Golgi se realiza mediante el aprovechamiento parcial de la ruta. Por ejemplo, la localización de proteínas a ambos lados o a través de la membrana del RE puede utilizar la partícula de reconocimiento de la señal de formas ligeramente distintas (Figura 6.18). Si la secuencia señal se encuentra más abajo del extremo amino de la proteína, el extremo amino puede que no sea insertado en la membrana y permanezca sobre la superficie citoplasmática. Secuencias hidrofóbicas de anclaje situadas en el interior de una proteína pueden hacer que buena parte de la secuencia permanezca en la superficie citoplasmática, o que sea retenida y anclada sobre la superficie de la luz de la membrana del RE. Múltiples secuencias de anclaje en un único polipéptido pueden hacer que éste atraviese la membrana en varios puntos y permanezca en gran parte ocluido. Estas secuencias hidrofóbicas están separadas por lazos polares cuya orientación está determinada por los residuos en los flancos cargados positivamente que predominan en el lado citoplasmático de la membrana.

La importación de proteínas por las mitocondrias requiere señales específicas

Las mitocondrias constituyen un problema de distribución de proteínas particularmente complejo, ya que algunas proteínas se encuentran localizadas específicamente en la matriz mitocondrial, en las membranas interna o externa, o en el espacio inter-

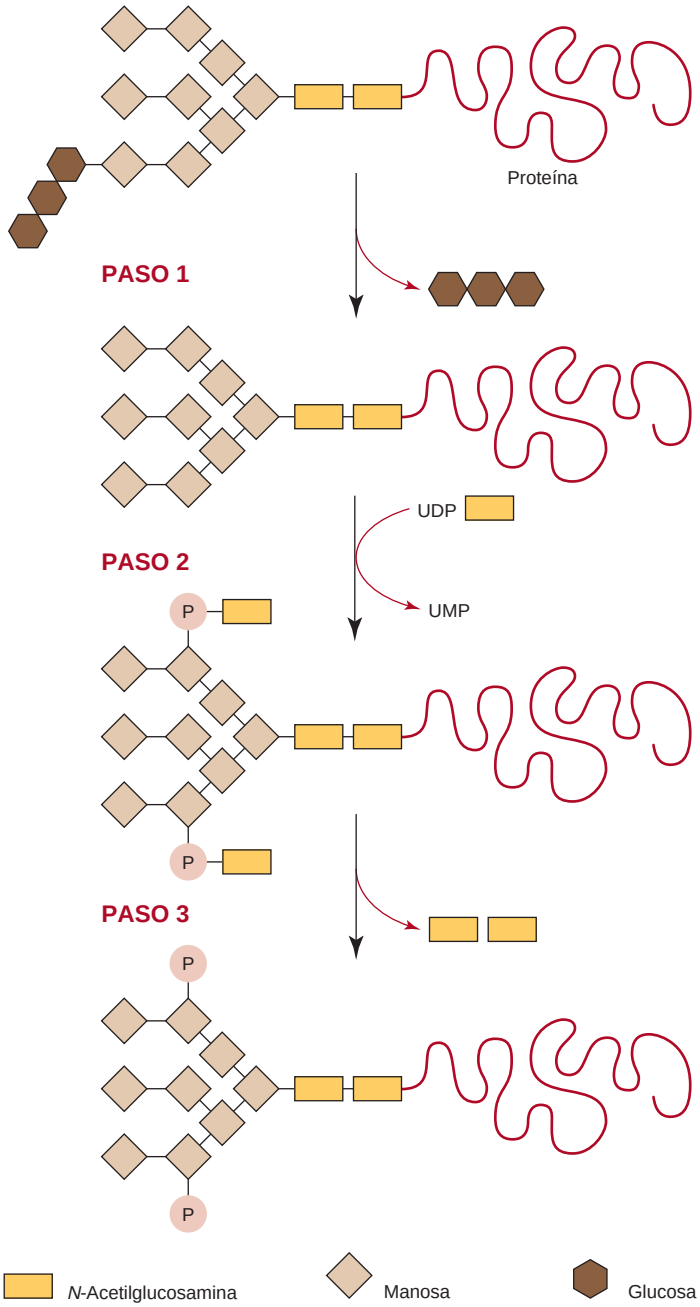
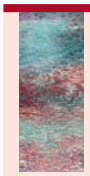


FIGURA 6.17
Marcaje de los enzimas con destino a los lisosomas.
La *N*-glucoproteína completa y plegada se libera de la membrana del retículo endoplasmático, y antes del transporte hacia el aparato de Golgi las glucosidasas eliminan los residuos de glucosa (paso 1). También puede eliminarse una manosa. Paso 2: En el aparato de Golgi una glucosiltransferasa une uno o, a veces, dos residuos de *N*-acetilglucosamina fosfato al oligosacárido. Paso 3: *N*-acetilglucosamina es eliminada por una glucosidasa, dejando uno o dos residuos de manosa 6-fosfato en el oligosacárido. A continuación, un receptor de manosa 6-fosfato reconoce a la proteína y la dirige hacia los lisosomas.
Adaptado de Kornfeld, R. y Kornfeld, S. Annu. Rev. Biochem. *54:631, 1985.*



APLICACIÓN CLÍNICA 6.8

Enfermedad de las células I

La enfermedad de las células I (mucolipidosis II) y la pseudo polidistrofia de Hurler (mucolipidosis III) son enfermedades relacionadas entre sí que se originan por defectos en el destino de enzimas lisosómicos, causados por una deficiencia en el enzima que transfiere la *N*-acetilglucosamina fosfato a los oligosacáridos del tipo de alto contenido en manosa de las proteínas destinadas a formar parte de los lisosomas. Los fibroblastos *in vitro* de individuos afectados por estas enfermedades muestran cuerpos de inclusión densos (de ahí el nombre de células I) y carecen de un gran número de enzimas lisosómicos, que son en cambio secretados al medio. Los pacientes poseen niveles anormalmente altos de enzimas lisómicos en el suero y otros fluidos corporales. La enfermedad se caracteriza por un retraso psicomotor grave, muchas anomalías esqueléticas, rasgos faciales toscos, y movimiento restringido de las articulaciones. Los síntomas suelen observarse a partir del nacimiento y progresan hasta la muerte del individuo, que suele producirse hacia los 8 años de edad. La pseudopolidistrofia de Hurler es una forma mucho más suave de la enfermedad. Suele aparecer entre los 2 y 4 años de vida, progresa de forma más lenta y los pacientes pueden sobrevivir hasta la madurez. Es posible el diagnóstico prenatal de ambas enfermedades, si bien no existe tratamiento definitivo para ellas.

Kornfeld, S. Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J. Clin. Invest.* 77: 1, 1986. Shields, D. y Arvan, P. Disease models provide insights into post-Golgi protein trafficking, localization and processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:489, 1999. For a comprehensive review see Kornfeld, S. y Sly, W. S. I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 3469.

membranoso. Casi todas estas proteínas son sintetizadas en el citosol en ribosomas libres, son transportadas (desplegadas) con ayuda de chaperonas y finalmente son importadas por las mitocondrias. En su mayor parte son sintetizadas en forma de proteínas de mayor longitud; las **presecuencias** N-terminales determinan el destino mitocondrial y también especifican el compartimiento mitocondrial al que deben ser transportadas. La **señal de destino a la matriz mitocondrial** no es una secuencia específica, sino una hélice α anfipática cargada positivamente, que es reconocida por un

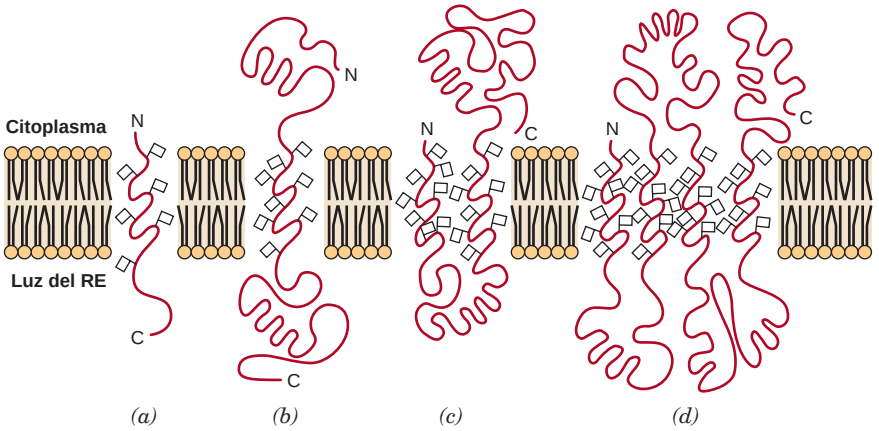


FIGURA 6.18
Topología de las proteínas en las membranas del retículo endoplasmático. En la figura se muestran varias orientaciones de las proteínas con respecto a la membrana. En (*a*) la proteína se encuentra anclada en la cara orientada hacia la luz de la membrana por medio de un péptido señal sin cortar, que contiene varios residuos hidrofóbicos. En (*b*) la secuencia señal no está tan cerca del extremo amino; por lo tanto, un dominio de la proteína se ha sintetizado previamente a la aparición del péptido señal. La traducción del resto de la proteína después de la inserción del péptido señal da lugar a una proteína con un dominio *N*-terminal citoplasmático, un segmento central que atraviesa la membrana, y una región carboxiterminal en la luz del RE. En (*c*) se muestra una proteína con la orientación opuesta: una secuencia señal *N*-terminal, que también puede haber sido cortada por la peptidasa señal, da lugar a la penetración de un segmento de la proteína en el interior de la luz del retículo. El anclaje de una segunda secuencia hidrofóbica en la membrana impide el paso del resto de la proteína a través de la membrana, permitiendo así la formación de un dominio C-terminal citoplasmático. En (*d*) varias señales internas y secuencias de anclaje sitúan a los distintos segmentos de la proteína a ambos lados de la membrana.

receptor mitocondrial. La proteína es translocada a través de ambas membranas al interior de la matriz mitocondrial mediante una reacción dependiente de energía. El paso tiene lugar en puntos de adhesión, donde las membranas mitocondriales interna y externa se encuentran más próximas, con la participación de varias proteínas intermembranosas. (Véase Apli. Clín. 6.5). Proteasas eliminan la secuencia que marca el destino mitocondrial, pero mantienen otras secuencias que determinan destinos ulteriores en el interior de la mitocondria. Por ejemplo, un precursor recortado del citocromo b_2 sufre una retrotranslocación a través de la membrana interna como respuesta a una secuencia señal hidrofóbica; la posterior proteólisis libera la proteína en el espacio intermembranoso. Por el contrario, la apoproteína del citocromo *c* (sin el grupo hemo) se une a la membrana externa y es transportada al interior del espacio intermembranoso, donde adquiere el grupo hemo y experimenta un cambio conformacional que evita su retorno al citosol. La localización en la membrana externa puede utilizar mecanismos de destino a la matriz para translocar parte de la proteína, pero la presencia de una larga secuencia apolar bloquea la transferencia completa y deja la proteína unida a la membrana con el dominio C-terminal en la superficie de la mitocondria.

El destino a otros orgánulos requiere señales específicas

El **núcleo** precisa importar un gran número de proteínas que forman parte de su propia estructura o que participan en los procesos de replicación del DNA, la transcripción y la biogénesis de los ribosomas. Los poros nucleares permiten el paso de proteínas pequeñas, pero las proteínas mayores poseen **señales de localización nuclear** específicas que contienen agrupaciones de aminoácidos básicos. Otras proteínas nucleares pueden permanecer en el núcleo formando complejos en su interior. Los **peroxisomas** contienen un número limitado de enzimas. Una señal de localización consiste en el tripéptido carboxilo terminal Ser-Lys-Leu (SKL). También se conoce un nonapéptido señal N-terminal, y seguramente algunas otras señales están todavía por descubrir.

Un problema diferente se plantea en la distribución de las proteínas que se encuentran en más de un compartimiento subcelular. En ocasiones, la duplicación génica y la divergencia han dado lugar a señales de localización diferentes en poli-

péptidos maduros estrechamente relacionados. Los sitios **alternativos de iniciación de la transcripción** o el corte y empalme del pre-mRNA pueden generar mensajes diferentes a partir de un único gen. Un ejemplo de esta segunda situación se observa en la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina; el **corte y empalme alternativo** genera mRNA que difieren en un segmento interno que codifica una señal de localización nuclear. Sin este segmento la proteína permanece en el citosol. Los sitios **alternativos de iniciación de la traducción** originan dos formas de la fumarasa hepática de rata, una de ellas incluye una señal de destino mitocondrial, mientras que la otra que no la posee permanece en el citosol. Una señal de localización subóptima puede dar lugar a un direccionamiento ineficiente y a una localización dual, tal como se observa en la secreción parcial de un inhibidor del activador del plasminógeno. Finalmente, algunas proteínas contienen más de una señal de localización, que compiten entre sí.

6.6 OTRAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

En la modificación de polipéptidos recién sintetizados pueden intervenir muchos fenómenos adicionales de maduración para generar la forma funcional final de la proteína. Muchos de estos acontecimientos son muy comunes, mientras que otros son específicos de unos pocos ejemplos conocidos.

La insulina y los zimógenos son activados por proteólisis parcial

La **proteólisis parcial** es una etapa común en los procesos de maduración de las proteínas. Pueden eliminarse secuencias de ambos extremos o del interior de la proteína. La proteólisis en el RE y en el aparato de Golgi contribuye a la maduración de la hormona peptídica insulina (Figura 6.19). La **preproinsulina** codificada por

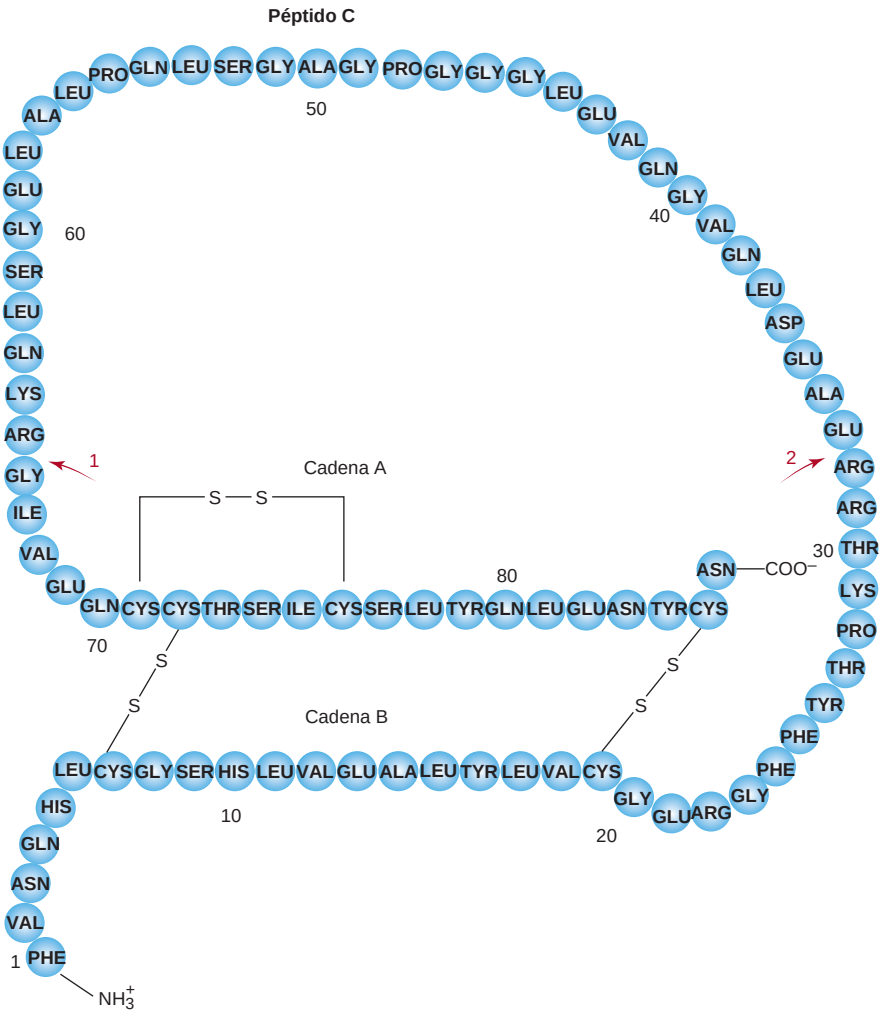


FIGURA 6.19
Maduración de la proinsulina humana. Después del corte en los dos sitios indicados por las flechas, los residuos arginina 31, 32 y 65 y el residuo lisina 64 se eliminan para dar lugar a la insulina y el péptido C.
Adaptado de Bell, G. I., Swain, W. F., Pictet, R., Cordell, B., Goodman, H. M. y Rutter, W. J. Nature *282:525, 1979.*

el mRNA es introducida en la luz del RE. Una peptidasa señal corta el péptido señal para generar la **proinsulina**, que se pliega para formar los puentes disulfuro correctos. La proinsulina es transportada al aparato de Golgi, donde es empaquetada en gránulos de secreción. Un **péptido de conexión** interno **(péptido C)** es eliminado por proteólisis y a continuación es secretada la **insulina** funcional. En la hiperproinsulinemia familiar la maduración es incompleta (véase la Apli. Clín. 6.9). Esta ruta de biosíntesis de la insulina posee ventajas respecto de la síntesis en forma de dos polipéptidos separados y posteriormente unidos. En primer lugar, asegura la producción de cantidades exactamente iguales de las cadenas A y B, sin necesidad de coordinar ambas actividades de traducción. En segundo lugar, la proinsulina se pliega en una estructura tridimensional, donde los residuos de cisteína se encuentran en la posición adecuada para la formación de los puentes disulfuro correctos. La proinsulina reducida y desnaturalizada se vuelve a plegar correctamente para formar la proinsulina, mientas que la renaturalización de la insulina reducida y desnaturalizada es poco eficiente, y se forman puentes disulfuro incorrectos.

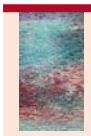
El corte de proteínas precursoras es un mecanismo corriente en la activación de enzimas. Las proteasas digestivas constituyen ejemplos clásicos de este fenómeno (véase p. 1098). Los zimógenos precursores inactivos están empaquetados en gránulos de almacenamiento, y se activan por proteólisis tras la secreción. Así, el corte del **tripsinógeno** da un péptido amino-terminal más tripsina, y el corte del quimotripsinógeno da **quimotripsina** y dos péptidos.

Los aminoácidos pueden ser modificados tras su incorporación en las proteínas

Sólo 20 aminoácidos están codificados genéticamente y son incorporados durante la traducción. Sin embargo, las **modificaciones postraducción** de las proteínas conducen a la formación de 100 o más derivados distintos de los aminoácidos. Las modificaciones pueden ser permanentes o rápidamente reversibles. Las cantidades de aminoácidos modificados pueden ser pequeñas, pero a menudo juegan un papel funcional de gran importancia en las proteínas de las que forman parte. La Tabla 6.10 recoge algunos ejemplos.

Los extremos aminoterminales de las proteínas presentan frecuentemente modificaciones. La síntesis proteica se inicia utilizando metionina, pero en general el residuo N-terminal no es metionina, pues ha sido eliminada por proteólisis. El amino terminal es modificado frecuentemente. La acetilación es común. Las subunidades α de las proteínas G de transducción (son fundametnales en la comunicación intercelular, véase p. 925) están derivatizadas con ácido mirístico o palmítico. Los residuos de glutamina amino-terminal se ciclan espontáneamente; un posible efecto es la estabilización de la proteína. Las secuencias amino terminales pueden alargarse en ocasiones por adición de aminoácidos (veáse la Sección 6.8 sobre la degradación de las proteínas).

La formación postraducción de puentes disulfuro está catalizada por una **disulfuro isomerasa**. La formación de puentes disulfuro estabiliza la conformación de las



APLICACIÓN CLÍNICA 6.9
Hiperproinsulinemia familiar

La hiperproinsulinemia familiar es una enfermedad autosómica dominante que da lugar a la presencia en el torrente sanguíneo de insulina y de proinsulina anormalmente procesada en cantidades similares. Aunque los individuos afectados presentan unos niveles altos de proinsulina en sangre, tienen un metabolismo de la glucosa aparentemente normal; no son diabéticos ni hipoglucémicos. En un primer momento se pensó que este defecto podría ser el resultado de una deficiencia en alguna de las proteasas que modifican la proinsulina. Hay tres enzimas encargados de la maduración de la proinsulina: dos endopeptidasas que cortan los enlaces petídicos Arg31–Arg32 y Lys64–Arg65 y una carboxipeptidasa. En algunas familias, el defecto consiste en la sustitución de la Arg65 por por una His o Leu, lo que impide el corte entre el péptido C y la cadena A de la insulina, lo que provoca la secreción de proinsulina parcialmente modificada. En una familia con hiperproinsulinemia se ha encontrado una mutación puntual His10 → Asp10. Se desconoce la forma en que esta mutación interfiere con la maduración.

Steiner, D. F., Tager, H. S., Naujo, K., Chan, S. J. y Rubenstein, A. H. Familial syndromes of hyperproinsulinemia with mild diabetes. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, pp. 897; y Zhou, A., Webb, G., Zhou, X. y Steiner, D. F. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 274:20745, 1999.

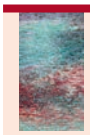
TABLA 6.10 Aminoácidos modificados presentes en las proteínas[a]

Aminoácido	*Modificación*
Extremo amino	Formilación, acetilación, aminoacilación, miristilación, glucosilación
Extremo carboxilo	Metilación, formación de anclas de glucosil-fosfatidilinositol, ADP-ribosilación
Arginina	*N*-metilación, ADP-ribosilación
Asparagina	*N*-glucosilación, *N*-metilación, desamidación
Ácido aspártico	Fosforilación, metilación, hidroxilación
Cisteína	Formación de cistina, formación de selenocisteína, palmitilación, unión a hemo, prenilación, ADP-ribosilación, *S*-glucosilación
Ácido glutáminco	Metilación, γ-carboxilación, ADP-ribosilación
Glutamina	Desamidación, entrecruzamiento, formación de piroglutamato
Histidina	Metilación, formación de diftamida, fosforilación, ADP-ribosilación
Lisina	*N*-acetilación, *N*-metilación, oxidación, hidroxilación, entrecruzamiento, ubiquitinación, formación de al-lisina, biotinilación
Metionina	Formación de sulfóxidos
Fenilalanina	Hidroxilación y glucosilación
Prolina	Hidroxilación y glucosilación
Serina	Fosforilación, glucosilación, acetilación
Treonina	Fosforilación, glucosilación, metilación
Triptófano	β-Hidroxilación, formación de dionas
Tirosina	Fosforilación, iodinación, adenilación, sulfonilación, hidroxilación

Fuente: Adaptado de Krishna, R. G. y Wold, F. Post-translational modification of proteins. En: A. Meister (Ed.), *Advances in Enzymology,* Vol. 67. New York: Wiley-Interscience, 1993, pp. 265–298.
[a]La lista no es completa y algunas de las modificaciones son muy raras. Obsérvese que no se han identificado en proteínas derivadas de glicina, alanina, isoleucina y valina.

proteínas. Los puentes disulfuro pueden evitar el desplegamiento de las proteínas y su paso a través de membranas, de modo que puede convertirse en un medio de localización. Como en el caso de la insulina, los puentes disulfuro pueden mantener unidas covalentemente cadenas polipeptídicas separadas y ser necesarios para la función biológica. También se producen modificaciones de la cisteína; por ejemplo, las subunidades γ de las proteínas G heterotriméricas son modificadas por la unión, mediante un enlace tioéster, de un isoprenoide a una cisteina situada en o cerca del extremo carboxi terminal. La deficiencia múltiple de sulfatasas tiene su origen en una capacidad reducida para llevar a cabo una modificación postraducción (véase Apli. Clín. 6.10).

La **metilación** de los grupos ε-amino de las lisinas tiene lugar en las histonas y puede modular su interacción con el DNA. Una fracción de la histona H2A tam-



APLICACIÓN CLÍNICA 6.10
Ausencia de modificaciones postraducción: deficiencia múltiple de sulfatasas

Diversas moléculas biológicas están sulfatadas; los ejemplos incluyen los glucosaminoglucanos, esteroides y glucolípidos. La sulfatación inefectiva de los glucosaminoglucanos sulfato de condroitina y sulfato de queratano (véase p. 684) del cartílago da lugar a importantes deformidades esqueléticas.

La degradación de las moléculas sulfatadas depende de la actividad de un grupo de sulfatasas relacionadas, muchas de las cuales se localizan en los lisosomas. La deficiencia múltiple de sulfatasas es un raro trastorno del almacenamiento lisosómico, que combina muchas de la características de la leucodistrofia metacromática y de la mucopolisacaridosis. Los individuos afectados se desarrollan lentamente y a partir del segundo año de vida pierden la capacidad para mantenerse de pie, sentarse o hablar; a continuación aparecen deformidades físicas y deficiencias neurológicas, produciéndose la muerte normalmente antes de la edad de diez años. Bioquímicamente, la deficiencia múltiple de sulfatasas se caracteriza por una gran pérdida de todas las sulfatasas. También se conocen deficiencias en sulfatasas individuales, y varias enfermedades están asociadas con defectos en un solo enzima.

El defecto molecular de la deficiencia múltiple de sulfatasas proviene de una deficiencia en la modificación postraducción común a todas las sulfatasas, que es necesaria para su actividad enzimática. En cada uno de los enzimas, un residuo de cisteína se convierte normalemente en ácido 2-amino-3-oxopropiónico; el grupo de la cadena lateral —CH_2SH de la cisteína se convierte en un grupo aldehído —CHO, que puede, a su vez, reaccionar con grupos amino o hidroxilo del enzima, un cofactor u otros. Los fibroblastos de los individuos con deficiencia múltiple de sulfatasas catalizan esta modificación con una eficiencia particularmente disminuida, y las sulfatasas no modificadas resultantes son catalíticamente inactivas.

Schmidt, B., Selmer, T., Ingendoh, A. y von Figura, K. A novel amino acid modification in sulfatases that is deficient in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82:271, 1995.

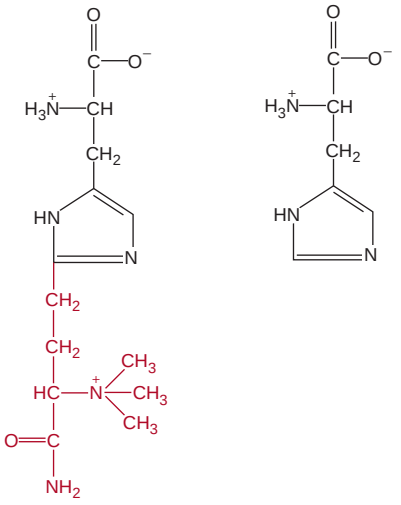


FIGURA 6.20
La diftamida (izquierda) es una modificación postraducción de un residuo específico de histidina (derecha) presente en el EF-2.

bién se modifica por conjugación con una pequeña proteína, la ubiquitina, mediante un enlace isopeptídico entre su glicina C-terminal y un grupo ε-amino de una lisina de la histona. Se ha propuesto que esta modificación juega un papel en las interacciones con el DNA. La biotina también se une a la lisina de algunas proteínas a través de un enlace amida.

Los grupos hidroxilo de la serina y la treonina son sitios principales de glucosilación y fosforilación reversible por proteína quinasas y proteína fosfatasas. Un ejemplo clásico de fosforilación de un residuo de serina es la glucógeno fosforilasa, modificada por la fosforilasa quinasa (véase p. 652). La actividad tirosina quinasa constituye una propiedad de muchos receptores de factores de crecimiento en los que la unión de factores de crecimiento estimula la proliferación de tipos celulares específicos. Los oncogenes, responsables en parte de la transformación y la proliferación de las células tumorales, a menudo tienen actividad tirosina quinasa y muestran una gran homología con los receptores de factores de crecimiento normales. Existen docenas de ejemplos similares; las proteína quinasas y las proteína fosfatasas regulan conjuntamente la actividad de numerosas proteínas que tienen un papel central en el desarrollo celular normal y anormal.

La ADP-ribosilación del EF-2 en un residuo de histidina modificado representa una doble modificación postraducción. En primer lugar, una histidina específica del EF-2 es modificada para generar el derivado diftamida (Figura 6.20) de la proteína funcional. La posterior ADP-ribosilación de la diftamida por la toxina diftérica inhibe la actividad del EF-2. La ADP-ribosilación fisiolólogica, no mediada por toxinas bacterianas, modifica residuos de arginina y cisteína. La formación de γ-carboxiglutamato a partir de residuos de ácido glutámico se da en varias proteínas de la coagulación de la sangre, entre ellas la protrombina y los factores VII, IX y X. Los residuos de γ-carboxiglutamato quelan los iones calcio, necesarios para la coagulación normal de la sangre (véase la p. 1045). En todos los casos, la modificación requiere vitamina K y puede ser bloqueada por derivados de la cumarina que antagonizan la vitamina K. El resultado es una notable disminución de la velocidad de coagulación. Las cumarinas tienen aplicación terapéutica en el control de la coagulación.

La biosíntesis del colágeno requiere muchas modificaciones postraducción

El colágeno, la familia de proteínas relacionadas más abundante en humanos, es una proteína fibrosa que suministra el entramado estructural de tejidos y órganos. Sufre una amplia variedad de modificaciones postraducción que afectan directamente a su estructura y función, y los defectos en estas modificaciones dan lugar a graves enfermedades. El colágeno proporciona un ejemplo excelente de la importancia de las modificaciones postraducción.

Las diferentes especies de colágeno, designadas como tipo I, II, III, IV, etc. (véase la p. 123 para los detalles de la estructura), están codificados en varios cromosomas y se expresan en diferentes tejidos. Las secuencias de aminoácidos difieren, pero la secuencia repetida **Gly-X-Y**, de unos 1000 residuos de longitud, es predominante. Cada tercer residuo es una glicina, cerca de un tercio de las posiciones X están ocupadas por prolina, mientras que la 4-hidroxiprolina, una modificación postraducción de la prolina, ocupa un número similar de posiciones Y. La prolina y la hidroxiprolina confieren una notable rigidez a la estructura, que es una hélice de poliprolina tipo II (Figura 6.21). Los polipéptidos del colágeno se designan como **cadenas α**; una molécula de colágeno consiste en tres cadenas α entrelazadas formando una **triple hélice** en la que los residuos de glicina ocupan el centro de la estructura (véase la p. 124).

Formación del procolágeno en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi

La síntesis de las cadenas α del colágeno comienza en el citosol, donde las secuencias amino terminales señal se unen a partículas de reconocimiento de señal. Las formas precursoras, designadas, por ejemplo, prepro α1(I), son introducidas en la luz del RE, y los péptidos señal cortados. La hidroxilación de los residuos de prolina y lisina tiene lugar **cotraduccionalmente** antes de la formación de la triple hélice. La propil 4-hidroxilasa precisa una secuencia -X-Pro-Gly (por lo tanto, la 4-hidroxiprolina se encuentra sólo en las posiciones Y de la secuencia -Gly-X-Y). También está presente en el RE una prolil 3-hidroxilasa que modifica un menor número de residuos de prolina, y una lisil hidroxilasa que modifica algunos de los residuos de lisina

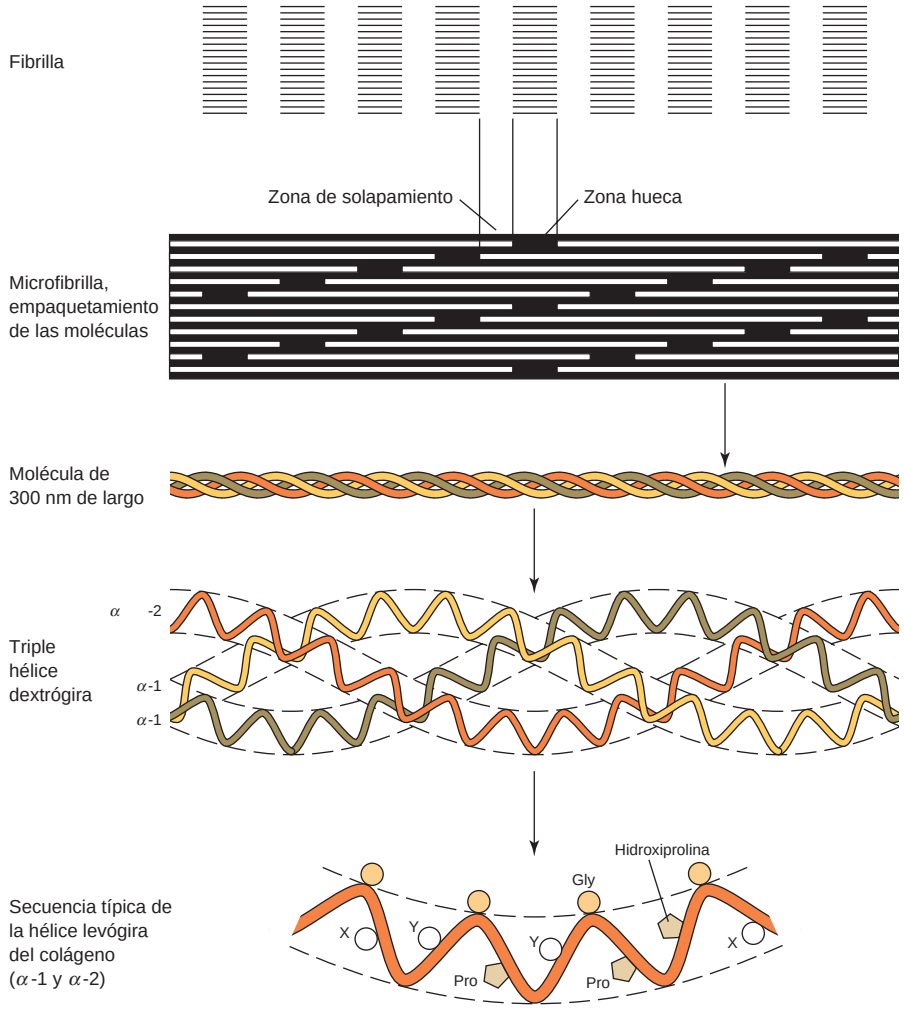


FIGURA 6.21
Estructura del colágeno en la que se muestra (de arriba abajo) la regularidad de la estructura primaria, la hélice levógira, la triple hélice dextrógira, la molécula de 300 nm y la organización de moléculas en una fibrilla típica, en la cual las moléculas de colágeno presentan enlaces cruzados.

en la posición Y. Estas hidroxilasas requieren Fe^{2+} y ácido ascórbico (vitamina C); el grado de modificación depende del tipo específico de cadena α. La hidroxilación de las prolinas estabiliza el colágeno, y la hidroxilación de las lisinas proporciona sitios para el entrecruzamiento de las cadenas y para la glucosilación por las glucosiltransferasas específicas del RE. Los residuos de aspargina son glucosilados también en este momento, dando lugar finalmente a oligosacáridos del tipo rico en manosa.

La **formación de la triple hélice** tiene lugar sólo después de la finalización de las cadenas polipeptídicas. Los dominios globulares carboxi-terminales de la proproteína se pliegan y se forman los puentes disulfuro. La interacción de estos dominios inicia el enrollamiento de la triple hélice desde el extremo carboxilo hacia el extremo amino. La triple hélice completa, con los dominios globulares de **proproteína** en cada extremo, es transportada al aparato de Golgi, donde se modifican y maduran los oligosacáridos. En algunos casos los residuos de tirosina son modificados por sulfatación y algunas serinas son fosforiladas. El procolágeno completo es liberado al exterior de la célula mediante vesículas secretoras.

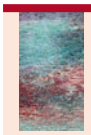
Maduración del colágeno

La conversión del procolágeno en colágeno tiene lugar en el exterior de la célula. Los propéptidos amino-terminal y carboxi-terminal son eliminados por proteasas distintas. Simultáneamente, las triple hélices se asocian en fibrillas y el colágeno se estabiliza a través de la formación extensiva de entrecruzamientos. La lisil oxidasa convierte algunos residuos de lisina o hidroxilisina en sus aldehídos reactivos, al-li-

TABLA 6.11 Algunas enfermedades de la estructura y biosíntesis del colágeno

Enfermedad	*Defecto del colágeno*	*Manifestaciones clínicas*
Osteogénesis imperfecta 1	Disminución en la síntesis del tipo I	Fracturas de los huesos largos antes de la pubertad
Osteogénesis imperfecta 2	Mutaciones puntuales y reordenaciones de exones en regiones helicoidales triples	Mortalidad perinatal; malformaciones y huesos blandos y frágiles
Ehlers–Danlos IV	Bajo nivel de secreción. Degración prematura del tipo III	Piel fina que se magulla fácilmente, rotura arterial y de colon
Ehlers–Danlos VI	Disminución de hidroxilisina en los tipos I y III	Piel hiperextensible, hipermovilidad en las articulaciones
Ehlers–Danlos VII	Acumulación de procolágeno del tipo I. No se corta el N-terminal del propéptido	Hipermovilidad en las articulaciones y dislocación
Cutis laxa (síndrome del cuerno occipital)	Disminución de hidroxilisina debida a una mala distribución de Cu	Piel laxa y blanda. Formación de un cuerno occipital en adolescentes

sina o hidroxi al-lisina. Estos residuos se condensan entre sí o con lisinas o hidroxilisinas de cadenas adyacentes para formar **bases de Schiff** y entrecruzamientos aldol. Otras reacciones menos conocidas que pueden implicar a otros residuos, entre ellos la histidina, pueden entrecruzar tres cadenas α. Se conoce la existencia de errores en muchas de estas etapas. Algunos de los mejor caracterizados están recogidos en la Tabla 6.11 y son descritos en la Apli. Clín. 6.11.



APLICACIÓN CLÍNICA 6.11
Defectos en la síntesis de colágeno

Síndrome de Ehlers–Danlos, tipo IV

El síndrome de Ehlers–Danlos es un grupo de al menos 10 enfermedades que son distinguibles por criterios clínicos, genéticos y bioquímicos, pero que tienen en común síntomas de debilidad estructural en el tejido conjuntivo. Los problemas comunes están relacionados con fragilidad e hiperextensibilidad de la piel, y con hipermovilidad en las articulaciones. La debilidad es resultado de defectos en la estructura del colágeno. Por ejemplo, el síndrome de Ehlers–Danlos tipo IV está causado por defectos en la estructura del colágeno del tipo III (véase p. 123), que es particularmente importante en la piel, arterias y órganos huecos. Entre sus características se cuentan la piel fina y transparente, a través de la cual se ven fácilmente las venas, magullaciones marcadas y, a veces, la apariencia senil de las manos y la piel. Los problemas clínicos surgen a causa de una rotura arterial, la perforación intestinal o la ruptura del útero durante el embarazo o el parto. El tratamiento quirúrgico es difícil debido a la fragilidad tisular. El defecto básico del síndrome de Ehlers–Danlos tipo IV parece estar causado por cambios en la estructura primaria de las cadenas de tipo III, derivados de mutaciones puntuales que sustituyen los residuos de glicina y que, por lo tanto, alteran la triple hélice del colágeno, y también de la eliminación de algunos exones, que da lugar a un acortamiento del polipéptido y puede redundar en una secreción ineficiente, en la disminución de la estabilidad térmica del colágeno y en una formación anormal de las fibrillas de colágeno de tipo III. En algunas ocasiones el colágeno tipo III se acumula en el retículo endoplasmático rugoso, se modifica en exceso y se degrada muy lentamente.

Superti-Furga, A., Gugler, E., Gitzelmann, R. y Steinmann, B. Ehlers–Danlos syndrome type IV: a multi-exon deletion in one of the two COL 3A1 alleles affecting structure, stability, and processing of type III procollagen. *J. Biol. Chem.* 263:6226, 1988.

Osteogénesis imperfecta

La osteogénesis imperfecta es un grupo de al menos cuatro enfermedades distinguibles por criterios clínicos, genéticos y químicos, que se caracteriza por fracturas múltiples que dan lugar a deformaciones óseas. Existen diversas variantes que resultan de mutaciones que dan lugar a cadenas α (I) modificadas. En el ejemplo más claro, una mutación por deleción causa la ausencia de un grupo de 84 aminoácidos en la cadena α1(I). Estas cadenas α1(I) acortadas logran sintetizarse gracias a que la mutación conserva el marco de lectura original. Las cadenas α1(I) cortas se asocian con cadenas α1(I) normales y con cadenas α2(I), impidiendo de esta manera la formación normal de la triple hélice, lo que da lugar a la degradación de todas las cadenas, un fenómeno que bien podría llamarse "suicidio proteico". Tres cuartas partes de las moléculas de colágeno tienen al menos, una cadena corta (defectusa, lo que constituye una amplificación del defecto genético heterocigótico) de colágeno α1(I). Otras formas de osteogénesis imperfecta son el resultado de mutaciones puntuales que sustituyen una de las glicinas por algún otro aminoácido. Ya que la glicina tiene que encajar en el interior de la triple hélice del colágeno, estas sustituciones desestabilizan esta hélice.

Barsh, G. S., Roush, C. L., Bonadio, J., Byers, P. H., y Gelinas, R. E. Intron mediated recombination causes an α(I) collagen deletion in a lethal form of osteogenesis imperfecta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2870, 1985.

Escorbuto y síntesis de hidroxiprolina

La mayor parte de los animales, pero no el hombre, pueden sintetizar ácido ascórbico (vitamina C). El escorbuto se produce por deficiencias de ácido ascórbico en la dieta. Entre otros problemas, la deficiencia en ácido ascórbico causa una disminución de la síntesis de hidroxiprolina debido a que la prolil hidroxilasa requiere ácido ascórbico. La hidroxiprolina proporciona átomos adicionales capaces de formar puentes de

hidrógeno que estabilizan la triple hélice de colágeno. El colágeno con una cantidad insuficiente de hidroxiprolina pierde estabilidad térmica, y es menos estable que el colágeno normal a la temperatura corporal. Las manifestaciones clínicas resultantes son evidentes y comprensibles: supresión del crecimiento óseo ordenado en los niños, cicatrización ineficiente y fragilidad capilar elevada con el resultado de hemorragias, particularmente en la piel. La deficiencia grave de ácido ascórbico también provoca a una disminución de la velocidad de síntesis del colágeno.

Peterofsky, B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am. J. Clin. Med.* 54:1135S, 1991.

Deficiencia de lisil hidroxilasa

En el síndrome de Ehlers–Danlos tipo IV existe una deficiencia en la lisil hidroxilasa. El resultado es la síntesis de los colágenos de tipo I y III (véase p. 123) de la piel con un menor contenido de hidroxilisina, que hace que el entrecruzamiento entre las fibrillas de colágeno sea menos estable. Aunque puede producirse un cierto grado de entrecruzamiento entre lisina y al-lisina, éste no es lo suficientemente estable y no madura tan rápidamente como lo hacen los entrecruzamientos entre hidroxilisinas. Además, se añaden residuos de glúcidos a la hidroxilisina, aunque la función de los mismos es desconocida. Las características clínicas incluyen una marcada hiperextensibilidad de la piel y las articulaciones, cicatrización difícil y deformidades músculo-esqueléticas. Algunos pacientes con esta forma del síndrome de Ehlers–Danlos tienen una forma mutante de lisil hidroxilasa con una constante de Michaelis para el ácido ascórbico mayor que el enzima normal. En consecuencia estos pacientes responden a dosis elevadas de ácido ascórbico.

Pinnell, S. R., Krane, S. M., Kenzora, J. E. y Glimcher, M. J. A heritable disorder of connective tissue: hydroxylysine-deficient collagen disease. *N. Engl. J. Med.* 286:1013, 1972.

Síndrome de Ehlers–Danlos, tipo VII

En el síndrome de Ehlers–Danlos tipo VII la piel se magulla fácilmente y es hiperextensible, pero las manifestaciones más importantes son la dislocación de las principales articulaciones como la cadera y la rodilla. La laxitud de los ligamentos se debe a la eliminación incompleta del propéptido amino terminal de las cadenas de procolágeno. Una variante de esta enfermedad es consecuencia de la deficiencia de la procolágeno *N*-proteasa. Una deficiencia similar se observa en la enfermedad autosómica recesiva llamada dermatosparaxis del ganado bovino y ovino y de los gatos, en la cual la fragilidad de la piel es tan extrema que puede llegar a ser letal. En otras variantes las cadenas de proα1(I) y proα2(I) pierden los aminoácidos del sitio de corte debido a la eliminación de un exón de los genes. Esto impide el corte normal por la procolágeno *N*-proteasa.

Cole, W. G., Chan, D., Chambers, G. W., Walker, I. D.y Bateman, J. F. Deletion of 24 amino acids from the proα(I) chain of type I procollagen in a patient with the Ehlers–Danlos syndrome type VII. *J. Biol. Chem.* 261:5496, 1986.

Síndrome del cuerno occipital

En el síndrome de Ehlers–Danlos tipo IX y en el síndrome de Menke del pelo rizado se cree que puede existir una deficiencia en la actividad de la lisil oxidasa. En el síndrome de Ehlers–Danlos tipo IX se presentan una serie de defectos en la formación de enlaces cruzados que dan lugar a una piel laxa y blanda y a la aparición durante la adolescencia de cuernos occipitales óseos. Los animales con deficiencia de cobre sufren una formación deficiente de enlaces cruzados entre la elastina y el colágeno, fenómeno debido aparentemente a la necesidad del ion cuproso por parte de la lisil oxidasa. En el síndrome de Menke del pelo rizado existe un defecto en el transporte intracelular de cobre que da lugar a una baja actividad de la lisil oxidasa, y en el síndrome del cuerno occipital también se produce un defecto en la distribución intracelular de cobre. Una mujer a la que se administraron dosis elevadas del fármaco quelante de cobre *d*-penicilamina dio a luz un niño con un síndrome adquirido de Ehlers–Danlos, que desapareció posteriomente. Entre los efectos secundarios del tratamiento con *d*-penicilamina se encuentran la cicatrización lenta de las heridas y una piel hiperextensible.

Peltonen, L., Kuivarnieme, H., Palotie, H., Horn, N., Kaitila, I. y Kivirikko, K. I. Alterations of copper and collagen metabolism in the Menkes syndrome and a new subtype of Ehlers–Danlos syndrome. *Biochemistry* 22:6156, 1983. Para una revisión detallada de las enfermedades del colágeno véase: Byers, P. H. Disorders of collagen biosynthesis and structure. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed., New York: McGraw-Hill, 2001, p. 5241.

6.7 REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

Las cantidades de proteína en las células están reguladas a nivel de la transcripción, la traducción y la degradación. La formación de proteínas funcionales tienen consecuencias importantes para la célula y la traducción requiere una considerable cantidad de energía. Es, pues, necesario que la traducción esté cuidadosamente controlada, tanto a nivel global como a nivel de proteínas específicas. El mecanismo más eficiente y más comúnmente empleado es la regulación de la fase de iniciación.

El mecanismo general de regulación de la transcripción mejor conocido implica la **fosforilación** reversible del eIF-2a. En condiciones de privación nutricional, choque térmico o infección vírica, el factor eIF-2a es fosforilado. El eIF-2a-GDP fosforilado se une fuertemente al eIF-2b, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina, presente en cantidad limitante. Al no estar el factor eIF-2b disponible para el intercambio nucleotídico no hay eIF-2a-GTP para la fase de iniciación. La fosforilación puede estar catalizada por una **quinasa inhibidora regulada por hemo**, que en ausencia de hemo se activa por autofosforilación. Esta quinasa está presente en muchas células, aunque la más estudiada es la procedente de los reticulocitos que sintetizan hemoglobina. Las deficiencias en el aporte energético o en cualquier precursor del grupo hemo activan la quinasa. Una quinasa relacionada, la **quinasa dependiente de RNA de doble hebra,** se autofosforila y se activa como respuesta a la unión al dsRNA presente en muchas infecciones víricas. El interferón también induce la pro-

ducción de esta quinasa. En cambio, el factor de iniciación eIF-4e se activa por fosforilación en respuesta a, por ejemplo, factores de crecimiento, y se inactiva por una proteína fosfatasa a consecuencia de, por ejemplo, una infección vírica. Estos efectos, mediados por el eIF-4g, que también se activa por fosforilación, pueden ser más importantes durante la traducción de mRNA con secuencias conductoras altamente estructuradas, que tienen que ser desenrolladas por el eIF-4a para que pueda identificarse el sitio de inicio de la traducción.

También puede regularse la traducción de genes específicos. Un claro ejemplo es la regulación mediante hierro de la síntesis de una proteína de unión de hierro, la ferritina. En ausencia de hierro, una proteína represora está unida al **elemento de respuesta al hierro** (IRE), una estructura tallo-bucle en el extremo 5′ del mRNA de la ferritina. Este mRNA queda secuestrado para su uso futuro. La ácido δ-levulínico sintasa, un enzima de la biosíntesis del grupo hemo, también se regula mediante la presencia de un IRE en el extremo 5′ de su mRNA. Por el contrario, si la cantidad de hierro es baja, se necesita más mRNA del receptor de la ferritina; este mensajero dispone de varios IRE en su región 3′ no traducida. La unión de la proteína represora estabiliza el mRNA prolongando su período de vida útil. Muchos mRNA regulados por el crecimiento, incluidos los de las proteínas ribosómicas, disponen de secuencias de polipirimidina en la secuencia conductora. Una proteína de unión a polipirimidina colabora en la regulación de su traducción.

6.8 | DEGRADACIÓN Y RECAMBIO DE PROTEÍNAS

Las proteínas tienen un tiempo de vida finito. Están sujetas a lesiones ambientales tales como oxidación, proteólisis o desnaturalización conformacional, y a otras modificaciones irreversibles. Los errores de la traducción y del plegamiento producen proteínas no funcionales, y la maduración proteolítica genera péptidos que tampoco son funcionales. Igualmente importante, las células necesitan cambiar su composición proteica para responder a diferentes requisitos y situaciones. En cualquier caso, es necesario eliminar los desechos. Las proteínas poseen períodos de vida muy distintos. Las células del cristalino del ojo no son reemplazadas y sus proteínas no son recicladas. La hemoglobina de los eritrocitos tiene la duración del tiempo de vida de estas células, unos 120 días. Otras proteínas tienen tiempos de vida menores, medibles en días, horas e incluso minutos. Algunas de las proteínas de la coagulación de la sangre sobreviven sólo durante unos pocos días, por eso los hemofílicos sólo encuentran protección durante un período de tiempo corto por medio de transfusiones o inyecciones de los factores requeridos. Los diabéticos precisan inyecciones regulares de insulina, ya que la hormona se metaboliza. Los enzimas metabólicos varían cuantitativamente en función de las necesidades; por ejemplo, los niveles de los enzimas del ciclo de la urea oscilan en respuesta a la dieta. La mayoría de los aminoácidos producidos por degradación de las proteínas son reciclados para sintetizar nuevas proteínas, aunque algunos son metabolizados y sus productos de degradación excretados. En todos los casos, la proteólisis reduce inicialmente las proteínas a péptidos, y finalmente a aminoácidos. Existen varios sistemas proteolíticos para llevar a cabo estas tareas.

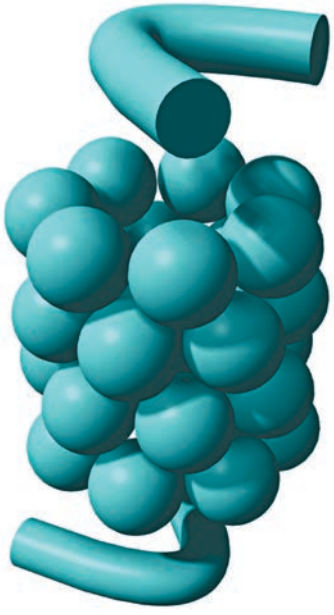


FIGURA 6.22
Modelo del proteasoma.
El segmento central 20S esta compuesto por cuatro anillos heptaméricos apilados de dos tipos. El núcleo central está hueco y consta de 12–15 polipéptidos diferentes; en los anillos se localizan varias proteasas con diferentes especificidades. Los segmentos en forma de V en cada extremo del cilindro son responsables del reconocimiento del sustrato dependiente de ATP, el desplegamiento y el transporte hasta el interior del núcleo proteolítico. La estructura del casquete superior está también en contacto con el segmento central, pero se representa desplazado en la figura para poder mostrar el núcleo central hueco del cilindro.
Adaptado de Rubin, D. and Finley, D. Curr. Biol. *5: 854, 1995; y Peters, J.-M.* Trends Biochem. Sci. *19:377, 1994.*

La proteólisis dependiente de ATP tiene lugar en los proteasomas

Una ruta proteolítica bien conocida es la de los **proteasomas**. Los proteasomas son estructuras cilíndricas formadas por unos 28 polipéptidos; un cilindro proteolíticamente activo está coronado en ambos extremos por complejos en forma de V (Figura 6.22). Los casquetes actúan en el reconocimiento y despliegue de los polipéptidos y en su transporte hasta el núcleo proteolítico mediante un mecanismo dependiente de ATP.

La destinación a los proteasomas normalmente requiere **ubiquitina**, una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada. Una de las funciones de las ubiquitina es marcar las proteínas para la degradación. La ubiquitina tiene otros papeles; por ejemplo, la unión de la ubiquitina a las histonas H2A y H2B no está relacionada con el recambio ya que estas proteínas son estables, sino posiblemente con cambios en la estructura de la cromatina o la transcripción.

El ciclo proteolítico dependiente de ubiquitina se ilustra en la Figura 6.23. La ubiquitina se activa por la acción del enzima E1, que forma un tioéster; es una re-

acción que requiere ATP, y en la que se forma un complejo transitorio AMP–ubiquitina. A continuación, la ubiquitina es transferida al enzima E2 y, finalmente, mediante uno de los enzimas del grupo E3, se acopla a la proteína diana. La unión de la ubiquitina se realiza a través de enlaces isopeptídicos entre los grupos ε-amino de residuos de lisina pertenecientes a la proteína y los residuos glicina de la región carboxi-terminal de la ubiquitina. Pueden unirse varias moléculas de ubiquitina a la proteína y también entre sí. Las proteasas de proteasoma degradan a continuación la proteína marcada, pero liberan intacta a la ubiquitina, que queda disponible para otros ciclos de degradación.

La proteólisis dependiente de ubiquitina juega un papel fundamental en la regulación celular. Las **ciclinas** y los receptores **proteína tirosina quinasa** están implicadas en el control de la división celular. La destrucción de una ciclina dependiente de ubiquitina permite a la célula el paso de la fase M a la G1, mientras que la degradación de los receptores impide la transducción de señales y detiene la proliferación celular. Entre la proteínas degradadas por proteolisis dependiente de ubiquitina se encuentran algunos factores de transcripción, el supresor tumoral p53 y otras oncoproteínas, una proteína quinasa y receptores de superficie celular y del sistema inmunitario.

Las proteínas dañadas, defectuosas o mutantes son rápidamente degradadas por la vía de la ubiquitina. En la **fibrosis quística**, una mutación que produce la deleción de un aminoácido altera en gran medida la estabilidad de una proteína (véase Apli. Clín. 6.6). No siempre está claro cómo se identifican las proteínas nativas para su degradación. El enzima E3 manifiesta selectividad; tanto la conformación como la secuencia de aminoácidos son importantes. Se han identificado secuencias PEST (ricas en Pro, Glu, Ser y Thr) desestabilizantes en varias proteínas de vida corta. Otro determinante es simplemente la identidad del aminoácido N-terminal. Proteínas por lo demás idénticas con residuos amino-terminales distintos son degradadas a velocidades muy variables, y el tiempo de vida de una proteína puede ser modificado incorporando un residuo N-terminal desestabilizante mediante un aminoacl-tRNA dador. Como en el caso de los proteasomas, las proteasas complejas Lon y Clp de *E. coli*, y otros enzimas similares en otros microorganismos y en las mitocondrias también requieren la hidrólisis de ATP para su acción, pero los procariotas no disponen de ubiquitina, y se desconocen los medios para la identificación de las proteínas que han de ser degradadas.

La digestión intracelular de algunas proteínas tiene lugar en los lisosomas

Otras vías proteolíticas también son importantes. La digestión intracelular de proteínas procedentes del exterior de la célula tiene lugar en los **lisosomas** ricos en proteasas. Los materiales frente a los cuales la membrana plasmática es impermeable son importados mediante procesos de endocitosis. En la **pinocitosis** son englobadas e ingeridas partículas de gran tamaño, agregados moleculares u otras moléculas presentes en el fluido extracelular. Los macrófagos ingieren bacterias y células muertas por este mecanismo. La **endocitosis mediada por receptores** emplea receptores de la superficie celular para unir moléculas específicas. La endocitosis tiene lugar en cavidades de la superficie celular, revestidas internamente con la proteína multimérica **clatrina**. La invaginación de la membrana plasmática y de los receptores forma vesículas intracelulares revestidas. Uno de los posibles destinos de estas vesículas es la fusión con un lisosoma y la degradación de su contenido. Un cierto grado de recambio proteico intracelular puede también tener lugar dentro de los lisosomas, y en ciertas condiciones, cantidades significativas de material celular puede ser movilizadas a través de los lisosomas; por ejemplo, en fibroblastos privados de suero o en ratas no alimentadas, tiene lugar la degradación lisosómica de una subpoblación de proteínas celulares. El reconocimiento de una secuencia peptídica específica está implicada, una indicación más de que el tiempo de vida de una proteína está codificada en su propia secuencia.

Hay muchos otros sistemas proteolíticos

Las proteasas dependientes de calcio, también denominadas **calpaínas**, están presentes en la mayoría de las células, así como los activadores e inhibidores de estos enzimas. Las calpaínas son, pues, candidatos lógicos para jugar un papel en el recambio proteico. Sin embargo, aún no se ha cuantificado su papel en estos proce-

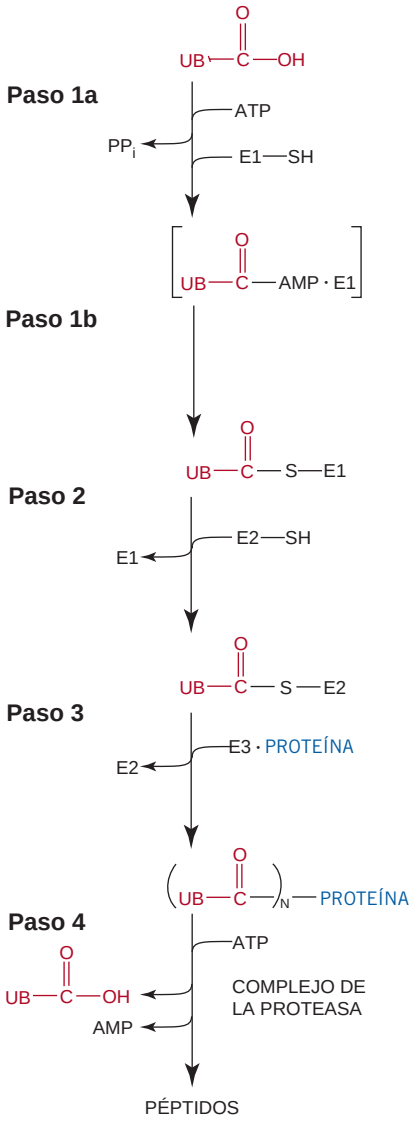


FIGURA 6.23
Degradación de proteínas dependiente de ATP y ubiquitina.
La ubiquitina se activa en una reacción de dos etapas que implican la formación de un intermediario transitorio anhídrido mixto entre el AMP y el extremo carboxilo de la ubiquitina (paso 1a), seguida de la formación de un tioéster con el enzima E1 (paso 1b). El enzima E2 puede ahora formar un tioéster con la ubiquitina (paso 2) y servir de dador en la transferencia de ubiquitina, catalizada por E3, a una proteína diana (paso 3). En esta etapa se pueden encontrar varias moléculas de ubiquitina unidas a distintas lisinas de la proteína. La proteína ubiquitinada es degradada por proteólisis dependiente de ATP (paso 4). La ubiquitina no se degrada, y puede entrar de nuevo en la primera etapa del ciclo.

sos. Las proteasas del aparato de Golgi y del RE degradan los fragmentos peptídicos que aparecen durante la maduración de las proteínas de las rutas secretoras. Podrían estar implicadas en el recambio de las proteínas del RE, aunque también se conocen proteínas que son exportadas por el RE para ser degradadas en los proteasomas. La **apoptosis**, o muerte celular programada, es consecuencia de la activación de proteasas conocidas como **caspasas**. Es probable que existan otros mecanismos aún sin caracterizar, tanto en el citosol como en las mitocondrias. Las proteasas digestivas como la pepsina, la tripsina, la quimotripsina y la elastasa hidolizan la proteína de la dieta y no participan en el recambio intracelular de las proteínas, pero los aminoácidos que generan contribuyen a la reserva metabólica utilizada en la traducción. Es probable que la degradación de las proteínas resulte ser tan compleja e importante como su biosíntesis.

BIBLIOGRAFÍA

Ribosomas y RNA de transferencia

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. y Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289:905, 2000.

Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N. y Noller, H. F. X-ray crystal structures of 70S ribosome structural complexes. *Science* 285:2095, 1999.

Filonenko, V. V. y Deutscher, M. P. Evidence for similar structural organization of the multienzyme aminoacyl-tRNA complex *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269:17375, 1994.

Hale, S. P., Auld, D. S., Schmidt, E. y Schimmel, P. Discrete determinants in transfer RNA for editing and aminoacylation. *Science* 276:1250, 1997.

Herold, M. y Nierhaus, K. H. Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262:8826, 1987.

Hong, K. W., Ibba, M., Weygand-Durasevic, I., Rogers, M. J., Thomann, H. U. y Söll, D. Transfer RNA-dependent cognate amino acid recognition by an aminoacyl-tRNA synthetase. *EMBO.* 15:1983, 1996.

Hou, Y.-M., Francklyn, C. y Schimmel, P. Molecular dissection of a transfer RNA and the basis for its identity. *Trends Biochem. Sci.* 14:233, 1989.

Muth, G. W., Ortoleva-Donnelly, L. y Strobel, S. A. A single adenosine with a neutral pK_a in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* 289:947, 2000.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. y Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289:920, 2000.

Nomura, M. The role of RNA and protein in ribosome function: a review of early reconstitution studies and prospects for future studies. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:653, 1987.

Perona, J., Rould, M. y Steitz, T. Structural basis for transfer RNA aminoacylation by *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 32:8758, 1993.

Silvian, L. F., Wang, J. y Steitz, T. A. Insights into editing from an Ile-tRNA synthetase structure with tRNA and mupirocin. *Science* 285:1074, 1999.

Biosíntesis de proteínas y su regulación

Agarwal, R. K., Heagle, A. B., Penczek, P., Grassucci, R. A. y Frank, J. EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome. *Nature Struct. Biol.* 6:643, 1999.

Barrell, B., et al. Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3164, 1980.

Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C. O., Shirmer, N. K., Sprinzl, M. y Hilgenfeld, R. Crystal structure of active elongation factor T_u reveals major domain rearrangements. *Nature* 365:126, 1993.

Burkhardt, N., Jünemann, R., Spahn, C. M. T. y Nierhaus, K. M. Ribosomal tRNA binding sites: three site models of translation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:95, 1998.

Gnirke, A., Geigenmuller, U., Rheinberger, H. y Nierhaus, K. The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. *J. Biol. Chem.* 264:7291, 1989.

Green, R. Ribosomal translocation: EF-G turns the crank. *Curr. Biol.* 10:R369, 2000.

Merrick, W. C. Eukaryotic protein synthesis: an *in vitro* analysis. *Biochimie* 76:822, 1994.

Nakamura, Y., Ito, K. y Ehrenberg, M. Mimicry grasps reality in translation termination. *Cell* 101:349, 2000.

Rhoads, R. E. Regulation of eukaryotic protein biosynthesis by initiation factors. *J. Biol. Chem.* 268:3017, 1993.

Samuel, C. E. The eIF2a protein kinases as regulators of protein synthesis in eukaryotes from yeasts to humans. *J. Biol. Chem.* 268:7603, 1993.

Song, H., et al. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1—mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 100:311, 2000.

Ziff, E. B. Transcription and RNA processing by the DNA tumour viruses. *Nature* 287:491, 1980.

Destino proteico y modificación postraducción

Batey, R. T., Rambo, R. P., Lucast, L., Rha, B. y Doudna, J. A. Crystal structure of the ribonucleoprotein core of the signal recognition particle. *Science* 287:1232, 2000.

Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. y Craig, E. A. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101:119, 2000.

Corsi, A. K. y Schekman, R. Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 271:30299, 1996.

Dahms, N. M., Lobel, P. y Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* 264:12115, 1989.

Danpure, C. J. How can products of a single gene be localized to more than one subcellular compartment? *Trends Cell Biol.* 5:230, 1995.

Dever, T. E. Translation initiation: adept at adapting. *Trends Biochem. Sci.* 24:398, 1999.

Dobson, C. M. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24: 329, 1999.

Ellgaard, L., Molinari, M. y Helinius, A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286:1882, 1999.

Feldman, D. E. y Frydman, J. Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:26, 2000.

Gilbert, H. F. Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 272:29399, 1997.

Koehler, C. M., Merchant, S. y Schatz, G. How proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem. Sci.* 24:428, 1999.

Krishna, R. G. y Wold, F. Post-translational modification of proteins. *Adv. Enzymol.* 67:265, 1993.

Kuhn, K. The classical collagens. In: R. Mayne y R. E. Burgeson (Eds.), *Structure and Function of Collagen Types.* Orlando, FL: Academic, 1987, p.1.

Paulson, J. C. y Colley, K. J. Glycosyltransferases: structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* 264:17615, 1989.

Petrescu, S. M., Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J. y Dwek, R. A. Tyrosinase and glycoprotein folding: role of chaperones that recognize glycans. *Biochemistry* 39:5229, 2000.

Rudd, P. M., et al. The effects of variable glycosylation on the functional activities of ribonuclease, plasminogen and tissue plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Acta* 1248:1, 1995.

Sachs, A. B. y Varani, G. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nature Struct. Biol.* 7:356, 2000.

Schimöller, F., Simon, I. y Pfeffer, S. R. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273:22161, 1998.

Stroud, R. M. y Walter, P. Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:754, 1999.

Subramani, S. Protein translocation into peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 271:32483, 1996.

Tokalidis, K. y Schatz, G. Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 274:35285, 1999.

Wedegaertner, P. B., Wilson, P. T. y Bourne, H. R. Lipid modification of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270:503, 1995.

Wickner, S., Maurizi, M. R. y Gottesman, S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286:1888, 1999.

Wolin, S. From the elephant to *E. coli:* SRP-dependent protein targeting. *Cell* 77:787, 1994.

Zhou, A., Webb, G., Zhu, X. y Steiner, D. F. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 274:20745, 1999.

Recambio proteico y proteasomas

Ciechanover, A. The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79:13, 1994.

DeMartino, G. N. y Slaughter, C. A. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274:22123, 1999.

Joazeiro, C. A. P., Wing, S. S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T. y Liu, Y. C. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin–protein ligase. *Science* 286:309, 1999.

Kessel, M., et al. Homology in structural organization between *E. coli* C1pAP protease and the eukaryotic 26S proteasome. *J. Mol. Biol.* 250:587, 1995.

Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. y Huber, R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268:533, 1995.

Miller, M. H., Finger, A., Schweiger, M. y Wolf, D. H. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin–proteasome pathway. *Science* 273:1725, 1996.

Rock, K., et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class II molecules. *Cell* 78:761, 1994.

Rogers, S., Wells, R. y Rechsteiner, M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234:364, 1986.

Wolf, B. B. y Green, D. R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* 274:20049, 1999.

PREGUNTAS — C. N. Angstadt

Preguntas de elección múltiple

1. La degeneración del código genético denota la existencia de:
   A. codones múltiples para un solo aminoácido.
   B. codones compuestos por tan solo dos bases.
   C. tripletes de bases que no codifican ningún aminoácido.
   D. diferentes sistemas de síntesis de proteínas en los que un determinado triplete codifica aminoácidos diferentes.
   E. codones que incorporan una o más bases "inusuales".

2. En la formación de un aminoacil-tRNA:
   A. el ADP y el Pi son productos de la reacción.
   B. el aminoacil-adenilato aparece en disolución como intermediario libre.
   C. se admite que la aminoacil-tRNA sintetasa reconoce e hidroliza los aminoacil-tRNA incorrectos que haya podido producir.
   D. hay una aminoacil-tRNA sintetasa distinta para cada aminoácido presente en la proteína final funcional.
   E. hay una aminoacil-tRNA sintetasa distinta para cada especie de tRNA.

3. Durante la iniciación de la síntesis proteica:
   A. aparece metionil-tRNA en el sitio A del complejo de iniciación 80S.
   B. eIF-3 y la subunidad ribosómica 40S participan en la formación del complejo de preiniciación.
   C. el GTP fosforila al eIF-2.
   D. se utiliza el mismo metionil-tRNA que durante la elongación.
   E. se forma un complejo consistente en mRNA, la subunidad ribosómica 60S y ciertos factores de iniciación.

4. Los requisitos para la síntesis proteica en eucariotas incluyen todos los siguientes EXCEPTO:
   A. mRNA.
   B. ribosomas.
   C. GTP.
   D. 20 aminoácidos diferentes en forma de aminoacil-tRNA.
   E. fMet-$tRNA_i^{met}$.

5. Durante la fase de elongación de la síntesis proteica eucariótica:
   A. el aminoacil-tRNA entrante se une al sitio P.
   B. se sintetiza un nuevo enlace peptídico por el sitio peptidiltransferasa de la subunidad ribosómica grande en una reacción que requiere GTP.
   C. el péptido, todavía unido a la molécula de tRNA, se traslada a un sitio diferente del ribosoma.
   D. la estreptomicina puede provocar la liberación prematura del péptido incompleto.
   E. la formación del enlace peptídico tiene lugar mediante el ataque del grupo carboxilo del aminoacil-tRNA entrante sobre el grupo amino de la cadena polipeptídica naciente.

6. La terminación de la síntesis proteica:
   A. requiere un codón de terminación en el sitio P de la subunidad ribosómica grande.
   B. ocurre cuando un factor proteico de liberación no ribosómico se une al ribosoma.
   C. requiere la acción de una hidrolasa no ribosómica para liberar al péptido.
   D. no requiere energía.
   E. coincide con la degradación de los ribosomas.

7. La formación de insulina madura incluye los siguientes aspectos EXCEPTO:
   A. eliminación de un péptido señal.
   B. plegamiento en una estructura tridimensional.
   C. formación de puentes disulfuro.
   D. eliminación de un péptido de una región interna.
   E. γ-carboxilación de residuos de glutamato.

8. La 4-hidroxilación de residuos específicos de prolina durante la síntesis de colágeno tiene los siguientes requerimientos EXCEPTO:
   A. Fe^{2+}.
   B. una secuencia específica de aminoácidos.
   C. ácido ascórbico.
   D. succinato.
   E. cadenas α individuales no asociadas todavía en una hélice triple.

9. Las chaperonas:
   A. siempre son necesarias para el plegamiento de las proteínas.
   B. cuando están unidas a una proteína aumentan su velocidad de degradación.
   C. se unen normalmente a regiones fuertemente hidrofílicas de las proteínas desplegadas.
   D. a veces mantienen las proteínas desplegadas para permitir su paso a través de las membranas.
   E. no requieren energía (ATP) para su acción.

10. La toxina de la difteria:
   A. actúa catalíticamente.
   B. libera cadenas polipaptídicas incompletas del ribosoma.
   C. activa la translocasa.
   D. evita que el factor de liberación reconozca las señales de terminación.
   E. ataca al RNA de la subunidad grande.

Preguntas 11 y 12: La fibrosis quística (CF) es una enfermedad bastante frecuente (1 por 2000) en los caucásicos. El gen de la CF codifica una proteína denominada regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que funciona como un canal de cloruro regulado por cAMP. La proteína tiene dos dominios transmembrana, dos dominios que interaccionan con ATP y un dominio regulador. El defecto más común es una deleción de tres nucleótidos en el gen de la proteína de uno de los dominios de unión de ATP. Como consecuencia, la proteína no se pliega correctamente en el retículo endoplasmático, no está correctamente glucosilada y no es transportada hasta la superficie celular; al contrario, es degradada en el citosol por los proteasomas.

11. La mutación concreta descrita anteriormente probablemente de lugar a una proteína que:
   A. sea más larga de como debería ser.
   B. sea varios aminoácidos más corta de cómo debería ser.
   C. tenga siempre una secuencia distinta a partir del lugar de la mutación que la proteína no mutada.
   D. tenga una sustitución de un aminoácido por otro en comparación con la proteína del gen no mutado.
   E. tenga una deleción de un aminoácido en comparación con la proteína del gen no mutado.

12. El marcaje de las proteínas para su degradación en los proteosomas normalmente requiere ubiquitina. En las funciones de la ubiquitina hay que considerar los siguientes aspectos EXCEPTO:
   A. se requiere ATP para la activación de la ubiquitina.
   B. se forma un enlace peptídico entre el carboxi terminal de la ubiquitina y el grupo ϵ-amino de una lisina.
   C. no siempre la unión de la ubiquitina marca una proteína para su degradación.
   D. la identidad del aminoácido N-terminal es un determinante de selección para la degradación.
   E. el enzima que transfiere la ubiquitina a la proteína que debe ser degradada requiere ATP.

Preguntas 13 y 14: El colágeno, el tipo de proteína más importante en el cuerpo humano, tiene una composición de aminoácidos poco habitual y requiere numerosas modificaciones prostraducción para convertirse en una proteína funcional. Como consecuencia de la complejidad de la síntesis del colágeno, hay muchas enfermedades causadas por defectos en el proceso. Estas enfermedades tienen como consecuencia la debilidad estructural del tejido conjuntivo. El síndrome de Ehlers-Danlos es un grupo de diez enfermedades diferentes del colágeno. El tipo VII del síndrome de Ehlers-Danlos es consecuencia de una deficiencia de la *N*-proteasa del procolágeno, que causa la eliminación incompleta del péptido amino terminal de las cadenas de procolágeno.

13. Durante la síntesis de colágeno, todos los procesos que se enumeran a continuación tienen lugar extracelularmente EXCEPTO:
   A. la modificación de residuos de prolina.
   B. el corte de un péptido amino terminal.
   C. el corte de un péptido carboxi terminal.
   D. la modificación de residuos de lisina.
   E. el entrecruzamiento covalente.

14. Puesto que el procolágeno se forma en su mayor parte en el RE y el aparato de Golgi, se requiere un péptido señal. Todas las afirmaciones siguientes acerca de la localización de una proteína en el RE son ciertas EXCEPTO:
   A. un péptido señal normalmente posee un N-terminal cargado positivamente y una serie de aminoácidos hidrofóbicos.
   B. a medida que el péptido señal emerge de un ribosoma libre se une a una partícula de reconocimiento de señal (SRP).
   C. habitualmente el péptido señal es cortado antes de que la proteína sea insertada en la membrana del RE.
   D. la proteína de anclaje es de hecho un receptor de SRP y sirve para unir la SRP al RE.
   E. La SRP y la proteína de anclaje no entran en la luz de RE sino que son recicladas.

Problemas

15. La enfermedad de las células I (cuerpos de inclusión) es consecuencia de un defecto en el enzima que transfiere *N*-acetilglucosamina fosfato a las proteínas que contienen oligosacáridos del tipo rico en manosa. ¿Qué enzima sería deficiente en los pacientes con esta dolencia? ¿Cuál es la correspondencia entre el nombre de la enfermedad y el problema que aqueja a los pacientes?

16. ¿Cuál es el significado de las siguientes estructuras? Una α-hélice anfipática cargada positivamente, una agrupación de residuos de lisina y arginina, y una secuencia Ser-Lys-Leu (SKL) carboxi-terminal.

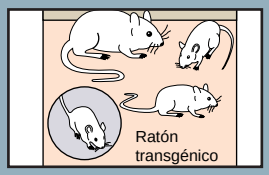
RESPUESTAS

1. **A** Es la definición de degeneración. No hay pruebas de que B y E tengan lugar, aunque en algunos casos el tRNA sólo lee las dos primeras bases de un triplete (balanceo), y a veces se dan bases inusuales en los anticodones. C se refiere a los codones de terminación (sin sentido). D es una desviación de la universalidad del código que se encuentran en las mitocondrias.

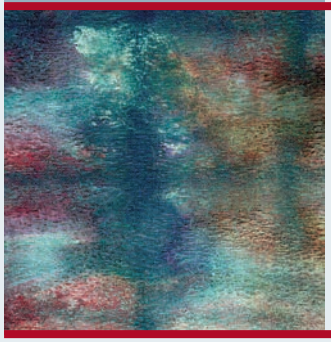
2. **C** Se pueden formar enlaces entre un tRNA y un aminoácido incorrecto más pequeño, pero son rápidamente hidrolizados. A y B: El ATP y el aminoácido reaccionan para formar un aminoacil-adenilato unido al enzima; el PP_i se libera al medio. D: Algunos aminoácidos, tales como la hidroxiprolina y la hidroxilisina, aparecen por modificación co- o postraducción. E: Una

aminoacil-tRNA sintetasa puede reconocer cualquiera de entre varios tRNA específicos para un determinado aminoácido.

3. **B** Este se une a continuación al mRNA. A: aparece un metionil-$tRNA_i^{met}$ en el sitio P. C: La fosforilación del eIF-2 inhibe la iniciación. D: el metionil-$tRNA_c^{met}$ se usa internamente. E: el mRNA se asocia primero con la subunidad 40S.
4. **E** El fMet-$tRNA_i^{met}$ está implicado en la iniciación de la síntesis de proteínas en procariotas. A-D, todos son necesarios.
5 **C** Es necesario liberar el sitio A para el siguiente tRNA entrante. A: el aminoacil-tRNA entrante interacciona con el sitio A. B: La formación del enlace peptídico no necesita de otra fuente de energía que la del aminoacil-tRNA. D: La estreptomicina inhibe la formación del complejo de inicio procariótico 70S (análogo al complejo eucariótico 80S) y provoca una lectura equivocada del código genético cuando ya está formado el complejo de iniciación. E: El par de electrones del grupo amino lleva a cabo el ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo carbonilo.
6. **B** El eRF humano es similar en forma y tamaño al tRNA. A: el codón de terminación se encuentra en el sitio A. C: la peptidil transferasa cataliza la hidrólisis. D: el eRF se une al complejo eRF-GTP. E: Las subunidades se disocian después de la terminación y son recicladas.
7. **E** La γ-carboxilación es de especial importancia en varias proteínas de la coagulación sanguínea pero no en la formación de la insulina. A: La preproinsulina es introducida en el interior del RE. B: Todas las proteínas, excepto las fibrosas, tienen que plegarse en una estructura tridimensional. C: La proinsulina se pliega y forma puentes disulfuro antes del corte de la cadena. D: Se conoce como péptido C.
8. **D** No es necesario. A, C: La prolil hidroxilasa requiere tanto Fe^{2+} como ácido ascórbico. B: La secuencia es –S-Pro-Gly-. E: La hidroxilación es cotraduccional.
9. **D** Esta es sólo una de las muchas funciones de las chapeonas. A: Muchas proteínas se pliegan espontáneamente de forma correcta. B: Las proteínas mal plegadas son reconocidas y rápidamente degradadas. C: Las chaperonas se unen a las regiones hidrofóbicas de las proteínas desplegadas. E: Las chaperoninas requieren ATP.
10. **A** Esta toxina cataliza la formación de un derivado ADP-ribosilo de la translocasa (EF-2), que inactiva irreversiblemente a la translocasa.
11. **E** La deleción de tres nucleótidos equivale a la deleción de un codón completo, por lo tanto el aminoácido en cuestión no está presente. A: Solamente sucedería si los tres nucleótidos delecionados fuesen un codón de terminación. B: La nueva proteína tiene un aminoácido menos, pero no varios. C: Este es un ejemplo de una mutación de cambio del marco de lectura causada por la deleción de uno o dos nucleótidos. La única forma de que esto sucediera con tres nucleótidos sería que éstos solapasen dos codones, lo que no parece ser el proceso usual. D: Es consecuencia de una mutación puntual.
12. **E** Se requiere ATP para la activación de la ubiquitina y en los pasos de la proteasa, pero no aquí. B, D: Ambos son correctos. C: La conjugación con las histonas no resulta en su degradación.
13. **A** La hidroxilación de las prolinas y de algunas lisinas es cotraduccional y por tanto intracelular. B y C requieren que las cadenas se hayan completado. D, E: Estos procesos están implicados en el entrecruzamiento, lo que implica que las tres cadenas deben estar ensambladas.
14. **C** La peptidasa señal se encuentra en la superficie de la luz del RE. A: Estas son características comunes junto con el segmento polar reconocido por la peptidasa señal. B, D, E: Todas ellas son características comunes del proceso.
15 Los lisosomas presentan graves deficiencias de muchos de los enzimas lisosómicos y, en cambio, se encuentran en niveles anormalmente altos en el suero y otros fluidos corporales. La manosa 6-fosfato es la señal de destino de los enzimas a los lisosomas. El primer paso consiste en la adición de *N*-acetilglucosamina fosfato a polisacáridos ricos en manosa. El corte subsiguiente, que deja el fosfato en el glúcido, produce la señal de manosa 6-fosfato. La falta de enzimas lisosómicos implica la acumulación de productos no degradados en los lisosomas y la consiguiente formación de cuerpos de inclusión.
16 Todas estas estructuras son señales de destino para el envío de proteínas a partículas subcelulares determinadas. Las tres indicadas son señales para las mitocondrias, el núcleo y los peroxisomas, respectivamente.



7



DNA RECOMBINANTE Y BIOTECNOLOGÍA

Gerald Soslau

7.1 VISIÓN GENERAL 280

7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA 281

7.3 ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y MAPAS DE RESTRICCIÓN 282

Las endonucleasas de restricción permiten la hidrólisis selectiva del DNA para obtener mapas de restricción 282
Los mapas de restricción permiten la preparación rutinaria de fragmentos de DNA definidos 283

7.4 SECUENCIACIÓN DE DNA 284

Método de rotura química: procedimiento de Maxam–Gilbert 284
Método enzimático interrumpido: procedimiento de Sanger 285

7.5 DNA RECOMBINANTE Y CLONACIÓN 287

Se puede ligar DNA de distintas procedencias para formar una nueva especie de DNA: DNA recombinante 287
Mediante clonación pueden producirse cantidades importantes de vectores de DNA recombinante 288
Clonación direccional: inserción de DNA en un vector con una orientación específica 289
Las bacterias se pueden transformar con DNA recombinante 290
Selección de las bacterias transformadas 290
Moléculas de DNA recombinante en una genoteca 291
La PCR hace innecesaria la clonación de DNA 291

7.6 SELECCIÓN DE UN DNA ESPECÍFICO CLONADO EN LAS GENOTECAS 293

Selección de bacterias transformadas aprovechando la pérdida de resistencia a antibióticos 293
La complementación-α en la selección de bacterias portadoras de plásmidos recombinantes 295

7.7 TÉCNICAS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A DNA 296

Los ácidos nucleicos pueden utilizarse como sondas para la detección de secuencias específicas de DNA y RNA 296
La técnica de transferencia Southern para la identificación de fragmentos de DNA 297
Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla 298
Métodos para detectar mRNA 300
Análisis de proteínas de unión específica al DNA 301

7.8 DNA COMPLEMENTARIO Y GENOTECAS DE DNA COMPLEMENTARIO 302

Para la síntesis de DNA con transcriptasa inversa se utiliza RNA mensajero como molde 302
Una muestra puede enriquecerse en un determinado mRNA mediante técnicas de separación 302
Síntesis de DNA complementario 303
El RNA celular total puede hacer de molde para la síntesis de DNA usando la RT-PCR 304

7.9 VECTORES DE CLONACIÓN EN BACTERIÓFAGOS, CÓSMIDOS Y LEVADURAS 305

Bacteriófagos como vectores de clonación 305
Rastreo de genotecas de bacteriófagos 305
Clonación de fragmentos de DNA en cósmidos y cromosomas artificiales de levadura 307

7.10 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE FRAGMENTOS LARGOS DE DNA 307

La subclonación permite caracterizar grandes segmentos de DNA 307
El paseo cromosómico es una técnica para definir la disposición de genes en fragmentos de DNA largos 308

7.11 VECTORES DE EXPRESIÓN Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN 309

Los genes foráneos expresados en bacterias hacen posible la síntesis de las proteínas que codifican 309

7.12 VECTORES DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS 310

Elementos del DNA necesarios para la expresión de vectores en células de mamífero 311
Selección de células eucarióticas transfectadas mediante el uso de células mutantes que requieren nutrientes específicos 311
Expresión de genes foráneos en células eucarióticas transformadas con virus 312

7.13 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA 312
Evaluación del papel de las regiones flanqueantes en el DNA mediante mutaciones de deleción e inserción 312
Mutagénesis dirigida de un único nucleótido 315

7.14 APLICACIONES DE LAS TECNOLOGÍAS DEL DNA RECOMBINANTE 318
Los ácidos nucleicos antisentido como herramientas de investigación y como agentes terapéuticos 318
Se pueden introducir genes normales en células con genes defectuosos: terapia génica 319
El DNA recombinante tiene un importante impacto comercial en agricultura 319

7.15 TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AL ANIMAL ENTERO 321
Animales transgénicos 321
Ratones genosuprimidos 321
Dolly, una oveja clonada a partir de una célula adulta 323

7.16 CONSIDERACIONES FINALES 323

BIBLIOGRAFÍA 324

PREGUNTAS 325

RESPUESTAS 326

APLICACIONES CLÍNICAS
7.1 Reacción en cadena de la polimerasa 282
7.2 Mapas de restricción y evolución 284
7.3 Secuenciación directa de DNA para el diagnóstico de enfermedades genéticas 287
7.4 Análisis por PCR múltiple de los defectos del gen de la *HGPRTasa* en el síndrome de Lesch–Nyhan 293
7.5 Los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción manifiestan el origen clonal de los tumores 299
7.6 Aplicación de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla para la detección de mutaciones espontáneas que pueden causar el SIDS 300
7.7 Mutagénesis dirigida del HSV I gD 315
7.8 En la terapia génica se introducen genes normales en células con genes defectuosos 320
7.9 Modelos de animales transgénicos 322
7.10 Los ratones genosuprimidos definen el papel del purinorreceptor $P2Y_1$ 323

7.1 VISIÓN GENERAL

Hacia 1970, el escenario estaba dispuesto para la eclosión de la biología molecular moderna gracias a los estudios de numerosos científicos durante los 30 años anteriores, durante los cuales avanzamos desde la ignorancia sobre las entidades bioquímicas que, con tanta fidelidad, orquestaban la replicación de las formas vivas, hasta una situación en la que era factible la manipulación de la expresión y la secuenciación de los genes. La marcha sin pausa hacia la comprensión profunda de la regulación génica en condiciones normales y patológicas ha progresado cada vez con mayor rapidez. El ácido desoxirribonucleico, compuesto sólo por cuatro nucleótidos diferentes unidos covalentemente mediante un esqueleto de azúcar–fosfato, es extremadamente complejo. La complejidad de la molécula de DNA viene dada por la secuencia no aleatoria de sus bases, las múltiples conformaciones que coexisten en equilibrio en el ambiente biológico y por proteínas específicas que reconocen determinadas regiones y se asocian a ellas. El conocimiento bioquímico de los procesos celulares y de sus componentes macromoleculares puso las bases necesarias para el salto adelante. Era evidente que la expresión génica estaba estrechamente regulada. Se habían purificado los enzimas que intervienen en la replicación del DNA y la transcripción del RNA, y se había definido su función en los procesos de síntesis. El código genético había sido descifrado y se habían confeccionado mapas genéticos de cromosomas procarióticos, basados en estudios de ligamiento génico con millares de mutantes diferentes. Finalmente, pudieron purificarse especies de RNA, hidrolizarse enzimáticamente en fragmentos discretos y secuenciarse laboriosamente. Sin embargo, el progreso ulterior en la comprensión de la regulación génica iba a requerir técnicas que permitieran cortar selectivamente el DNA en trozos homogéneos. Aunque pequeños, los genomas de DNA vírico muy purificados eran demasiado complejos para ser descifrados. La idea de manejar el genoma humano, con sus más de 3×10^9 pares de bases, era entre todas la más ambiciosa.

La identificación, purificación y caracterización de endonucleasas de restricción, que cortan con precisión las moléculas de DNA en secuencias específicas, permitió el desarrollo de los métodos del DNA recombinante. El desarrollo de la secuenciación de DNA abrió las puertas de la biología molecular, antes herméticamente cerradas, a los secretos guardados en el interior de la organización de los diversos genomas biológicos. Los genes pudieron ser finalmente secuenciados, pero, quizá todavía más importante, también lo fueron las regiones flanqueantes que regulan su expresión. La secuenciación de regiones reguladoras de numerosos genes definió secuencias consenso, tales como las encontradas en promotores, potenciadores y muchos sitios de fijación para proteínas reguladoras (véase el Capítulo 8). Todos los genes poseen un promotor en el lado 5′ al que se une la RNA polimerasa depen-

diente de DNA antes del inicio de la transcripción. Mientras que algunos sitios reguladores del DNA se encuentran justo al lado del sitio de iniciación de la transcripción en dirección 5′, otras regiones reguladoras se encuentran cientos o miles de bases más arriba, mientras otras incluso se encuentran más abajo.

Este capítulo presenta muchas de las sofisticadas técnicas, desarrolladas en los últimos 30 años, que permiten la disección de genomas complejos en fragmentos definidos y el análisis completo de la secuencia nucleotídica y de la función de estos fragmentos de DNA. La modificación y manipulación de genes, es decir, la ingeniería genética, facilita la introducción y expresión de genes tanto en células procarióticas como eucarióticas. Muchas metodologías se han visto simplificadas sobremanera mediante el empleo de un método, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica rápidamente regiones seleccionadas del DNA. Ahora se producen fácilmente proteínas para uso clínico y experimental, y se prevé que en un futuro no muy lejano estos métodos permitirán el tratamiento de enfermedades genéticas mediante terapias de sustitución génica. También se describen los usos actuales y potenciales de la tecnología del DNA recombinante. Nunca podrá exagerarse el impacto sobre la sociedad del conocimiento y la manipulación de las macromoléculas de interés genético.

7.2 LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

El análisis detallado de la secuencia y la función de una región determinada del DNA requiere grandes cantidades del segmento de DNA purificado. El desarrollo de la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** permitió la producción rápida de grandes cantidades de una secuencia específica de DNA. La PCR requiere dos oligómeros nucleotídicos que sean complementarios de las hebras del DNA en la región que deba amplificarse. Los oligómeros actúan de cebadores para que la DNA polimerasa extienda cada cadena. La repetición del ciclo de la PCR proporciona grandes cantidades de cada molécula de DNA en cuestión de horas, en comparación con los días y a veces semanas que son necesarias utilizando técnicas de clonación.

La amplificación por PCR de una secuencia de DNA específica puede aplicarse a una muestra de DNA purificado o a una pequeña región en una mezcla compleja de diferentes DNA. Los fundamentos de esta reacción se muestran en la Figura 7.1. La secuencia de DNA a amplificar debe ser previamente conocida o bien debe ser clonada en un vector (véase p. 305) para poder aprovechar así las secuencias flanqueantes conocidas. La PCR produce moléculas de DNA de doble hebra (dsDNA) y los ciclos se completan una vez todos los moldes han sido copiados. Para iniciar una nueva ronda de replicación, la muestra se calienta para desnaturalizar el dsDNA y, en presencia de un exceso de oligonucleótidos cebadores, se enfría para permitir la hibridación del molde monohebra con los oligómeros libres. Entonces se inicia un nuevo ciclo en presencia de DNA polimerasa y los cuatro desoxiribonucleósidos trifosfato (dNTP). El calentamiento hasta los 90ºC que se requieren para desnaturalizar el DNA inactiva la mayoría de las DNA polimerasas, pero ahora se usa una polimerasa termorresistente, la DNA polimerasa Taq, aislada de *Thermus aquaticus,* que hace innecesaria la adición de nuevo enzima en cada ciclo de replicación. Ello ha permitido la automatización de la PCR y posibilitado la amplificación de una molécula de DNA hasta un millón de veces.

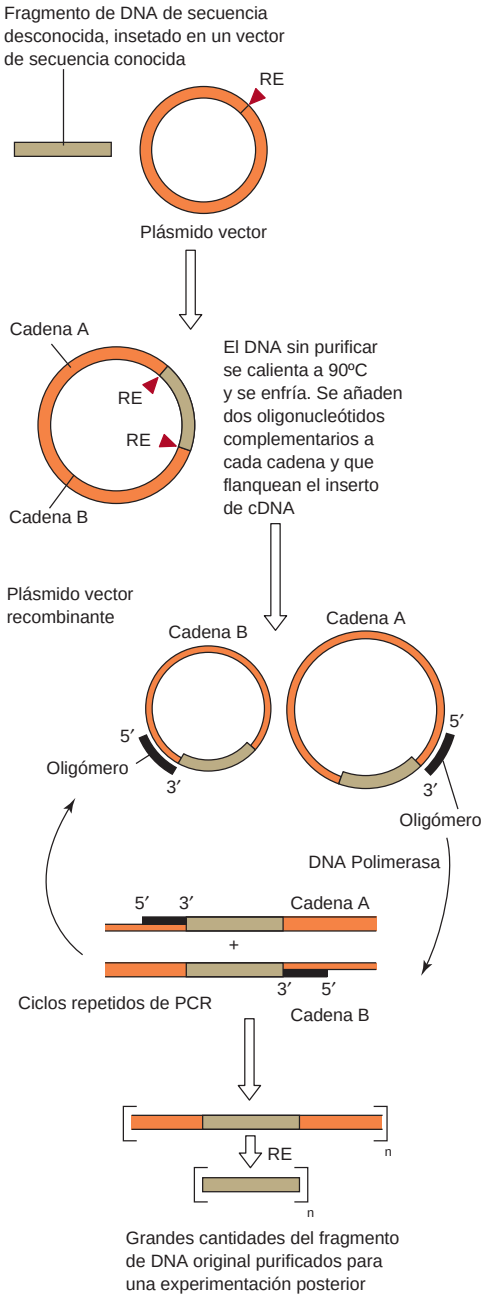
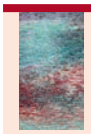


FIGURA 7.1
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
Un fragmento de DNA de secuencia desconocida se inserta en un vector de secuencia conocida mediante metodologías habituales de recombinación. No es necesario purificar el DNA recombinante. El DNA se calientea a 90ºC para disociar las cadenas dobles y se enfría en presencia de un exceso de dos oligómeros complementarios diferentes que hibridan con secuencias conocidas del DNA vector que flanquean el inserto de DNA foráneo. Sólo las especies de DNA recombinante de cadena simple actúan como moldes para la replicación del DNA, dando lugar a fragmentos de DNA de cadena doble del DNA foráneo delimitado por las secuencias de DNA de los oligómeros. El ciclo de calentamiento–replicación se repite muchas veces para producir rápidamente grandes cantidades del fragmento de DNA foráneo. El fragmento de DNA puede purificarse a partir de la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa cortándolo con la endonucleasa de restricción original (RE), separando la mezcla de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa y eluyendo del gel la banda de interés.



APLICACIÓN CLÍNICA 7.1

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa y el rastreo del virus de la inmunodeficiencia humana

La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar cantidades muy pequeñas de DNA ha revolucionado las posibilidades de detectar y analizar especies de DNA. Con la PCR es posible sintetizar suficiente DNA para su análisis. La detección e identificación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mediante métodos convencionales, tales como la transferencia Southern de DNA y análisis de antígenos, es laboriosa, cara y poco sensible. Con estos procedimientos, un individuo infectado sin síntomas de SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) puede dar un falso negativo para el VIH. La detección temprana de la infección por VIH en estos individuos es crucial para iniciar el tratamiento y seguir el curso de la enfermedad. Además, se requiere un método sensible para tener la certeza absoluta de que la sangre procedente de donantes no contiene VIH. La amplificación por PCR de secuencias de DNA potencialmente pertenecientes al VIH a partir del DNA aislado de los leucocitos permite la identificación de infecciones víricas antes de la aparición de anticuerpos, en el denominado estado seronegativo. Los métodos actuales son demasiado costosos para aplicarlos al control a gran escala de las muestras de los donantes de sangre. La reacción en cadena de la polimerasa también puede utilizarse para aumentar la sensibilidad en la detección y caracterización de secuencias de DNA de cualquier otro patógeno de los humanos.

Kwok, S. y Sninsky, J. J. Application of PCR to the detection of human infectious diseases. En: H. A. Erlich (Ed.). *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press, 1989, p. 235.

La reacción en cadena de la polimerasa anidada para detectar microquimerismo

Se ha demostrado que los leucocitos de los donantes transferidos a los pacientes que reciben transfusiones sanguíneas sobreviven en la sangre periférica de los receptores. La significación, si es que la tiene, de esta población microquímerica de leucocitos, está por descubrir. Uno de los mejores métodos para la detección de células procedentes de los donantes en los pacientes de las transfusiones es la detección de polimorfismos en la región HLA-DR del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) mediante PCR. La PCR anidada es al menos 100 veces más sensible que la PCR estándar. Sin embargo, debido a la mayor sensibilidad, pueden aparecer productos no específicos, debidos al cebado erróneo, generalmente asociados a pseudogenes. Es, pues, necesario establecer un patrón de referencia con muestras todavía no utilizadas en las transfusiones. Una vez excluidos los falsos positivos, la detección de los leucocitos del donante resulta considerablemente mejorada.

Carter, A. S., Cerundolo, L., Bunce, M., Koo, D. D. H., Welsh, K. I., Morris, P. J. y Fuggle, S. V. Nested polymerase chain reaction with sequence-specific primers typing for HLA-A, -B, and -C alleles: detection of microchimerism in DR-matched individuals. *Blood* 94:1471, 1999.

Cuando el DNA a amplificar está presente en concentraciones muy bajas respecto al DNA total de la muestra, es posible amplificar el DNA de interés junto a otras secuencia espurias. En esta situación es posible mejorar la especificidad de la reacción mediante el uso de la **PCR anidada**. Después de realizar 10–20 ciclos de amplificación con un conjunto de cebadores se separa una pequeña alícuota de la reacción con la que se realiza una segunda PCR. No obstante, esta segunda PCR se lleva a cabo con una nuevo conjunto de cebadores complementarios de una región del lado 3′ de los primeros cebadores o que estén "anidados" entre los cebadores originales. Este procedimiento amplifica la región de interés del DNA dos veces y con una gran especificidad.

La PCR tiene muchas aplicaciones en el diagnóstico genético, las investigaciones forenses, en las cuales a menudo tan sólo se dispone una gota de sangre seca o de un único cabello, y los estudios evolutivos con material biológico conservado. La Apli. Clín. 7.1 describe el uso de la PCR para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana y de la PCR anidada para detectar el microquimerismo.

7.3 | ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y MAPAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción permiten la hidrólisis selectiva del DNA para obtener mapas de restricción

La naturaleza posee un conjunto variado de herramientas, las **endonucleasas de restricción**, capaces de diseccionar selectivamente moléculas de DNA de muchos tamaños y orígenes en fragmentos más pequeños. Estos enzimas protegen a las bacterias de los virus invasores, los bacteriófagos. Las secuencias de DNA bacteriano, normalmente reconocidas por una endonucleasa de restricción, están protegidas contra el corte por la metilación de las bases situadas dentro del palíndromo, mientras que el DNA vírico no metilado es reconocido como extraño y es hidrolizado. Se han iden-

tificado y purificado numerosas endonucleasas de restricción de tipo II con diferente especificidad de secuencia; en la actualidad, muchas están disponibles comercialmente (en la p. 72 se comentan las actividades de las endonucleasas de restricción).

Las endonucleasas de restricción permiten la construcción de un nuevo tipo de mapa genético, el **mapa de restricción**, en el que se identifica el sitio de corte enzimático dentro del DNA. Especies de DNA purificadas que contienen secuencias para una endonucleasa de restricción son cortadas por ésta. Variando el tiempo de digestión de las moléculas de DNA purificadas por la endonucleasa de restricción, se puede generar una población de fragmentos de DNA de diferentes tamaños total o parcialmente hidrolizados. La separación de estos fragmentos generados enzimáticamente mediante electroforesis en gel de agarosa permite la obtención de mapas de restricción; en la Figura 7.2 se presenta un ejemplo de este procedimiento con DNA circular. El análisis de un DNA completamente hidrolizado por una endonucleasa de restricción establece el número de sitios reconocidos por la endonucleasa dentro de la molécula, así como el tamaño de los fragmentos generados. La distribución de los tamaños de fragmentos mixtos generados por el corte enzimático parcial de las moléculas de DNA pone de manifiesto el orden de todos los fragmentos potenciales. La utilización secuencial de diferentes endonucleasas de restricción ha permitido obtener un mapa de restricción detallado de numerosas especies de DNA circular, entre las que se cuentan plásmidos bacterianos, virus y DNA mitocondrial. El método es también aplicable a fragmentos de DNA lineal previamente purificados hasta la homogeneidad.

Los mapas de restricción permiten la preparación rutinaria de fragmentos de DNA definidos

Los mapas de restricción por sí mismos dan poca información acerca de los genes o elementos reguladores contenidos en los diferentes fragmentos de DNA. Se han

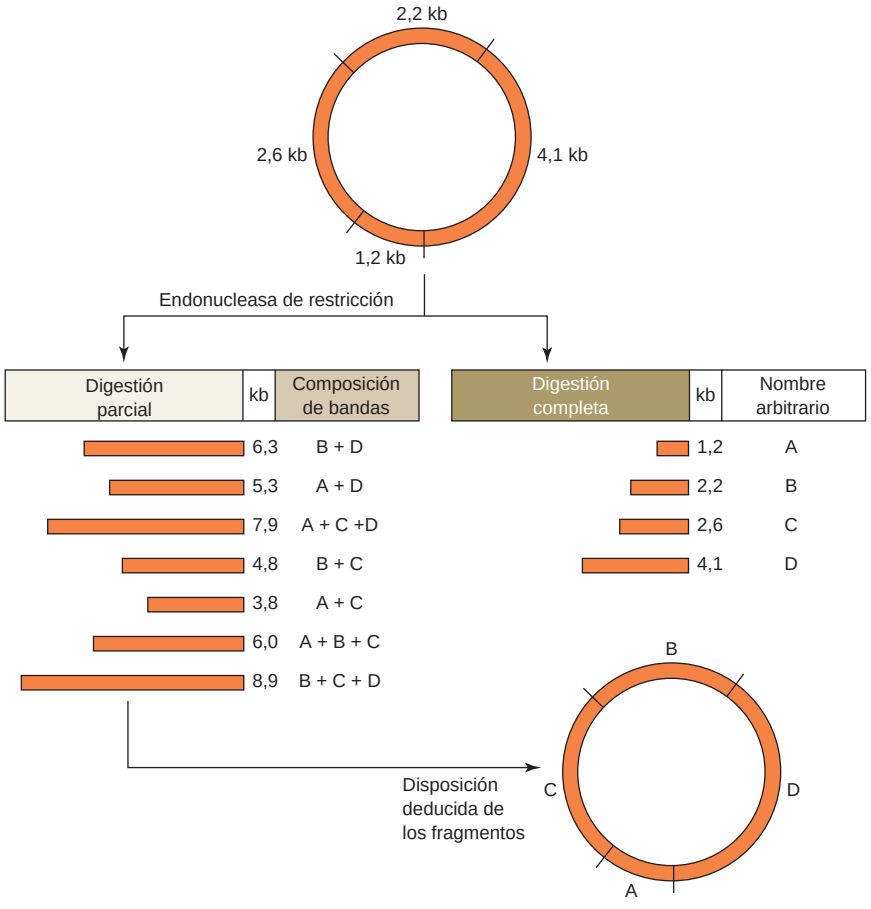
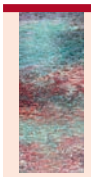


FIGURA 7.2
Obtención del mapa de restricción de un DNA. El DNA purificado se digiere con endonucleasas de restricción durante períodos de tiempo diferentes, generándose fragmentos de DNA que están parcial o completamente cortados. Los fragmentos de DNA se separan por electroforesis en gel de agarosa y se tiñen con bromuro de etidio. Las bandas de DNA se visualizan con una fuente de luz UV y se fotografían. El tamaño de los fragmentos de DNA se determina comparando su migración relativa a través del gel con estándares de DNA incluidos en el gel. La disposición relativa de cada fragmento en la molécula de DNA puede deducirse a partir del tamaño de los fragmentos parcialmente hidrolizados.



APLICACIÓN CLÍNICA 7.2

Mapas de restricción y evolución

En el pasado, los estudios de evolución de las especies se basaban solamente en los cambios anatómicos observados en el registro fósil, y en el datado por carbono. Más recientemente, estos estudios se han apoyado en el análisis molecular de la secuencia y tamaño de genes seleccionados o de moléculas de DNA enteras. Los cambios evolutivos de una molécula de DNA específica, procedente de distintas especies, pueden determinarse rápidamente mediante la obtención de mapas de restricción. La obtención de mapas de endonucleasas de restricción requiere una preparación de DNA puro. Las mitocondrias de mamífero contienen una molécula de DNA circular covalente cerrado de 16 569 pares de bases que puede purificarse rápidamente a partir de las células. El DNA mitocondrial (mtDNA) puede utilizarse directamente en el estudio de los cambios evolutivos en el DNA sin necesidad de clonar un gen específico.

Se purificó DNA mitocondrial del babuino de Guinea, el macaco, el cercopiteco y los humanos, y se cortó con 11 endonucleasas de restricción diferentes. Se eleboraron mapas de restricción para cada especie. Los mapas se alinearon en relación a la dirección y al sitio nucleotídico de iniciación de la replicación del DNA. La comparación de los sitios de corte de las endonucleasas de restricción permitió calcular el grado de divergencia de las secuencias de nucleótidos entre las especies. Se halló que la frecuencia de sustitución de bases (calculada a partir del grado de divergencia respecto al tiempo de divergencia) era alrededor de diez veces mayor que la del genoma nuclear. Esta alta frecuencia de mutación de las moléculas de mtDNA, que pueden ser fácilmente purificadas, convierte el mtDNA en un modelo excelente para estudiar las relaciones evolutivas entre especies.

El análisis del mtDNA también puede usarse para estudiar los patrones de migración de poblaciones que se establecieron en regiones geográficas distintas, pero que poseen los mismos patrones de restricción. Los nativos americanos han sido agrupados en cuatro haplogrupos principales sobre la base de sus patrones de restricción del mtDNA. Estos grupos parece que emigraron desde Asia y Siberia hace 18 000 años, justo antes de la primera glaciación.

Brown, W. M., George, M. Jr., y Wilson, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1967, 1979; Schurr, J. G. Mitochondrial DNA and the people of the new world. *Am. Sci.* 88:246, 2000.

utilizado para mostrar la variabilidad intraespecífica de las secuencias del DNA de los orgánulos, como por ejemplo el DNA mitocondrial (véase la Apli. Clín. 7.2). También pueden utilizarse para detectar mutaciones por deleción, allí donde un fragmento de DNA definido procedente de la cepa parental se propaga como un fragmento más pequeño en la cepa mutada. La utilidad principal de las microtijeras enzimáticas utilizadas para generar mapas de restricción es el corte del DNA en fragmentos homogéneos definidos que pueden purificarse fácilmente. Estos mapas son cruciales para la clonación y la secuenciación de los genes y de sus regiones flanqueantes.

7.4 SECUENCIACIÓN DEL DNA

Para explorar las complejidades de la regulación de la expresión génica y establecer las causas de las enfermedades genéticas se necesitaban técnicas que permitiesen la determinación de la secuencia exacta de las bases en el DNA. A finales de los años 70 se desarrollaron dos técnicas de secuenciación diferentes, una por A. Maxam y W. Gilbert, el método de rotura química, y otra por F. Sanger, el método enzimático. Ambos procedimientos utilizan el marcaje de un nucleótido terminal, seguido de separación y detección de los oligonucleótidos generados.

Método de la rotura química: procedimiento de Maxam–Gilbert

Este procedimiento requiere: (1) marcaje del nucleótido terminal, (2) hidrólisis selectiva del enlace fosfodiéster para cada nucleótido separadamente para generar fragmentos con 1, 2, 3, o más bases, (3) separación cuantitativa de los fragmentos hidrolizados, y (4) determinación cualitativa del marcaje añadido en el paso 1. A continuación se describe un protocolo del **procedimiento de Maxam–Gilbert**. En la Figura 7.3 se presenta el protocolo global.

Se marca selectivamente con ^{32}P un extremo de cada una de las cadenas del DNA. Esto se consigue cuando un fragmento de DNA de cadena doble contiene sitios para una endonucleasa de restricción a ambos lados de la región que ha de secuenciarse. La hidrólisis del DNA con dos endonucleasas de restricción diferentes genera entonces extremos escalonados diferentes, cada uno con una base diferente en la primera posición de la región de cadena simple. El marcaje del extremo 3′ de cada cadena se lleva a cabo con la adición del nucleótido siguiente de acuerdo con la secuencia de bases de la cadena de DNA complementaria. Un fragmento de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, denominado **fragmento Klenow**, cataliza esta reacción. El fragmento Klenow, obtenido por proteólisis parcial del holoenzima de la polimerasa, carece de actividad exonucleasa 5′ → 3′, pero mantiene las actividades polimerasa y exonucleasa 3′ → 5′. Por lo tanto, en experimentos separados, puede marcarse selectivamente cada cadena. Al analizar la secuencia de la cadena marcada, no se detectará la cadena complementaria no marcada.

La hidrólisis del DNA marcado en fragmentos de diferente longitud se lleva a cabo en primer lugar destruyendo selectivamente una o dos de las bases de los cuatro nucleótidos. El procedimiento utilizado expone el enlace fosfodiéster, que conecta bases contiguas, y permite el corte selectivo del DNA en la base modificada. En tratamientos químicos por separado, se tratan muestras de DNA marcado para modificar las purinas y las pirimidinas sin romper el esqueleto de azúcar–fosfato; actualmente, no se dispone de un método para modificar específicamente la adenina o la timina. Las condiciones para la modificación de las bases se escogen para que en cada molécula sólo se destruyan una o unas pocas bases al azar. Las cuatro muestras de DNA se hacen reaccionar por separado con **piperidina**, que rompe químicamente el esqueleto de azúcar–fosfato por los sitios donde se ha destruido una base, y así se generan fragmentos de distinto tamaño. Ya que el marcaje del extremo es específico, mientras que la modificación química de la base es al azar e incompleta, alguno de los fragmentos estará marcado terminalmente. Por ejemplo, dondequiera que un residuo de citosina haya sido destruido al azar, en el tubo de reacción apropiado se producirá un corte en el fragmento de DNA. La serie de fragmentos de DNA marcados terminalmente, generados químicamente en cada uno de los cuatro tubos, se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida. Las bases destruidas cerca del ex-

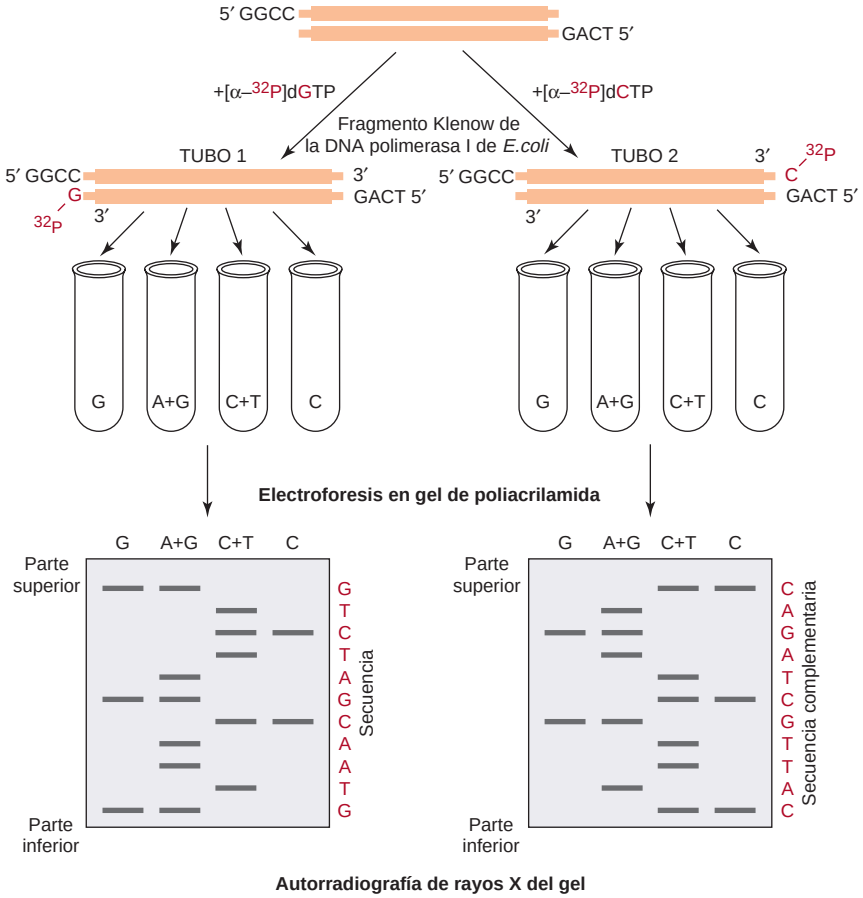


FIGURA 7.3
Método de secuenciación química de DNA de Maxam–Gilbert.
Por corte con una endonucleasa de restricción y posterior purificación se obtiene el fragmento de DNA de cadena doble que se va a secuenciar. Se secuencian ambas cadenas marcando selectivamente los extremos de cada una de las cadenas del DNA. Una de las cadenas del DNA se marca terminalmente con [^{32}P]dGTP en el tubo de reacción 1, mientras que la otra se marca terminalmente con [^{32}P]dCTP en el tubo de reacción 2. El DNA marcado terminalmente se subdivide entonces en cuatro fracciones, en las que las diferentes bases se destruyen químicamente en posiciones al azar dentro de la molécula de DNA de cadena simple. La destrucción química menos selectiva de la adenina destruye simultáneamente la G, mientras que la destrucción de la timidina destruye las bases C. El DNA de cadena simple se corta por los sitios de las bases destruidas. Esto genera fragmentos marcados terminalmente que presentan todas las longitudes posibles, correspondientes a la distancia que va desde el extremo hasta los sitios de destrucción de base. Los fragmentos de DNA marcados se separan según su tamaño por electroforesis. La secuencia de DNA puede determinarse a continuación a partir de los patrones electroforéticos por autorradiografía.

tremo marcado terminalmente generarán fragmentos que, como especies de pequeña masa molecular, migrarán más rápidamente a través del gel, mientras que los fragmentos derivados de bases destruidas más distantes del extremo migrarán a través del gel más lentamente, como corresponde a moléculas de mayor masa molecular. A continuación, el gel se expone a una película de rayos X, que detecta el ^{32}P, para visualizar las bandas del gel marcadas radiactivamente. La secuencia puede leerse manualmente o por métodos automáticos directamente a partir de la autorradiografía de rayos X, empezando desde la parte inferior de la película (fragmentos más pequeños) hacia la parte superior (fragmentos más grandes). La secuenciación de la cadena complementaria confirma que la secuencia es correcta.

Método enzimático interrumpido: procedimiento de Sanger

El **procedimiento de Sanger** de secuenciación de DNA se basa en la terminación al azar de una cadena de DNA durante su síntesis enzimática. La técnica es posible gracias a que el didesoxinucleótido análogo de cada uno de los cuatro nucleótidos normales (Figura 7.4) puede ser incorporado por la DNA polimerasa a una cadena de DNA en crecimiento. La desoxirribosa del **didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP)** tiene los grupos OH de las posiciones 2′ y 3′ sustituidos por un protón, mientras que un desoxinucleótido (dNTP) tiene sólo el grupo OH en posición 2′ sustituido por un protón. Por lo tanto, el ddNTP incorporado en la cadena creciente es incapaz de formar un enlace fosfodiéster con otro dNTP, ya que la posición 3′ de la desoxirribosa no contiene un grupo OH. La molécula de DNA en crecimiento puede terminar en puntos al azar, que vayan desde el primer nucleótido incorporado hasta el último, mediante la inclusión en el sistema de reacción tanto del nucleótido normal como del ddNTP (p. ej., dATP y ddATP) a concentraciones en las que ambos nucleótidos compiten por la incorporación.

La identificación de los fragmentos de DNA requiere el marcaje del extremo 5′ de las moléculas de DNA o la incorporación de nucleótidos marcados durante la sín-

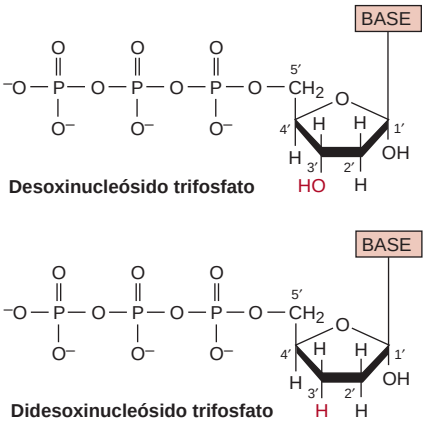
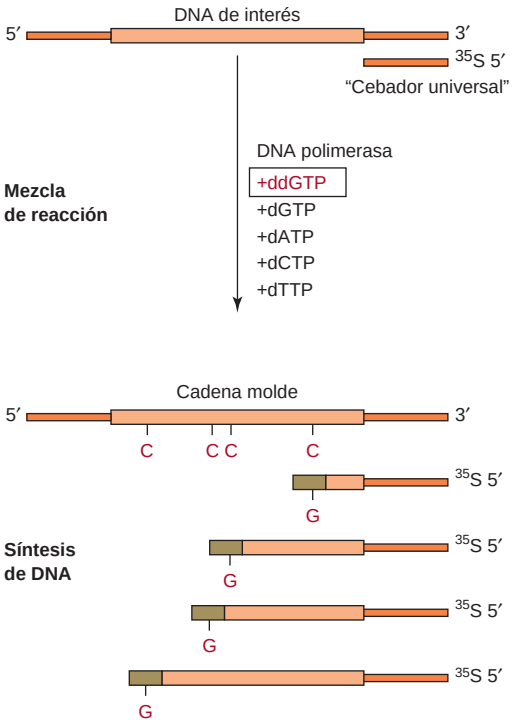
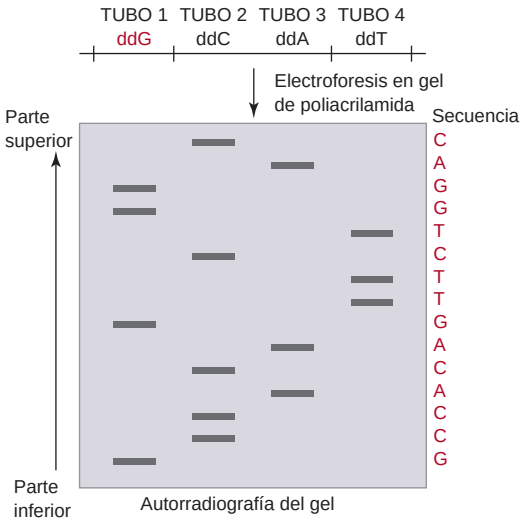


FIGURA 7.4
Estructura de un desoxinucleósido trifosfato y de un didesoxinucleósido trifosfato.
La desoxirribosa del didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) carece del grupo 3′-OH. Esta molécula puede incorporarse a una molécula de DNA en crecimiento a través de un enlace fosfodiéster con sus grupos 5′-fosfato. Una vez incorporado, el ddNTP bloquea la síntesis de la molécula de DNA, ya que carece del grupo 3′-OH aceptor para un nucleótido entrante.

tesis. La técnica, resumida en la Figura 7.5, funciona mejor con DNA de cadena simple puro; sin embargo, también puede utilizarse DNA de cadena doble desnaturalizado. El DNA para secuenciar se aísla frecuentemente de un bacteriófago de cadena simple recombinante (p. 305), en el que una región adyacente al DNA a secuenciar contiene una secuencia complementaria de un cebador universal. El cebador puede marcarse tanto con un nucleótido con ^{32}P como con ^{35}S. La extensión del cebador se lleva a cabo con alguna de las diferentes DNA polimerasas disponibles; una muy versátil es una forma modificada genéticamente de la DNA polimerasa del bacteriófago T7. La mezcla de reacción, compuesta por el DNA problema, cebador marcado y los cuatro desoxinucleósidos trifosfato, se divide en cuatro tubos, cada uno con un dide-

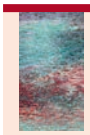


(a) Bacteriófago M13 recombinante



(b) Electroforésis en gel de poliacrilamida de la mezcla de reacción

FIGURA 7.5
Método del didesoxinucleósido trifosfato de Sanger para secuenciar DNA. Se inserta el fragmento de DNA a secuenciar en una molécula de DNA de bacteriófago. La replicación del bacteriófago produce una molécula de DNA recombinante de cadena simple que se purifica fácilmente. La secuencia conocida del DNA de bacteriófago en el extremo 3′ del inserto de DNA sirve de lugar de hibridación para un oligómero marcado terminalmente de secuencia complementaria, que hace las veces de cebador universal. La extensión de este cebador es catalizada con una DNA polimerasa en presencia de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato más un didesoxinucleósido trifosfato, como por ejemplo el ddGTP. La síntesis se detiene cada vez que en la molécula en crecimiento se incorpora un didesoxinucleósido trifosfato. Obsérvese que durante la incorporación, el didesoxinucleótido compite con el desoxinucleótido, lo que genera la producción de fragmentos de DNA marcados terminalmente de todas las longitudes posibles, que se separan por electroforesis. A partir de los patrones electroforéticos puede determinarse la secuencia del DNA.



APLICACIÓN CLÍNICA 7.3

Secuenciación directa de DNA para el diagnóstico de enfermedades genéticas

La deficiencia del factor de coagulación IX es la causa de la hemofilia B, una enfermedad recesiva de transmisión hereditaria asociada al cromosoma X. Se ha clonado y secuenciado el gen del factor IX. Contiene 8 exones que abarcan una región de 34 kb que codifica una glucoproteína excretada por el hígado. Se han descubierto más de 300 mutaciones en el gen, el 85% de las cuales son sustituciones de una sola base, mientras que el resto son deleciones totales o parciales. Se han empleado varios métodos para detectar los portadores de una copia defectiva, así como para el diagnóstico prenatal. Desgraciadamente, estos métodos eran muy costosos, consumen mucho tiempo y muy frecuentemente son poco precisos. Para obviar estos problemas se ha utilizado la secuenciación directa del DNA genómico amplificado por PCR. Es posible obtener fácilmente entre 0,1 y 1 μg de DNA genómico a partir de muestras de sangre del paciente, y cada exón del factor IX puede ser amplificado por PCR utilizando los cebadores adecuados. El DNA amplificado puede ser secuenciado directamente para determinar si existe alguna mutación asociada a alguna de las forma de la hemofilia B. Por ejemplo, un paciente con una hemofilia B moderada (London 6) tenía una transición A a G en la posición 10 442 que daba lugar a la sustitución del Asp64 por una Gly.

Green, P. M., Bentley, D. R., Mibashan, R. S., Nilsson, I. M., y Gianelli, F. Molecular pathology of hemophilia B. *EMBO J.* 8:1067, 1989.

soxinucleósido trifosfato diferente. Durante la síntesis enzimática del DNA, los ddNTP se incorporan al azar y provocan la terminación de la cadena. Ya que, en la mezcla de reacción, el ddNTP está presente a baja concentración respecto al correspondiente dNTP, la terminación de la síntesis de DNA se produce al azar en todos los posibles sitios complementarios del DNA molde. Esto da lugar a una población de moléculas de DNA de diferentes tamaños, marcadas en el extremo 5′, que pueden separarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Por autorradiografía de rayos X se detectan las especies marcadas y, a continuación, se puede leer la secuencia.

Inicialmente, este método requería un molde de DNA de cadena simple, la producción de un oligonucleótido complementario cebador específico y una preparación relativamente pura del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Estas dificultades se han superado y las modificaciones introducidas han simplificado el procedimiento. El método de Sanger puede secuenciar rápidamente hasta 400 bases, mientras que el método de Maxam–Gilbert está limitado a unas 250.

Los métodos de la PCR y de Sanger se pueden combinar para la **secuenciación directa** de pequeñas regiones de DNA. El producto de doble cadena de la PCR se emplea directamente como molde. Se establecen unas condiciones para que una cadena de DNA desnaturalizado (molde) hibride con el cebador con preferencia a la hibridación del molde con su cadena complementaria. A continuación se procede a la secuenciación por el método estándar de la reacción de terminación con el didesoxinucleótido (habitualmente con Sequenasa en lugar de la polimerasa Klenow) con síntesis de cadenas de longitud aleatoria que son extensiones del cebador de la PCR. Este método se ha empleado con éxito para el diagnóstico de enfermedades genéticas (véase la Apli. Clín. 7.3).

7.5 DNA RECOMBINANTE Y CLONACIÓN

Se puede ligar DNA de distintas procedencias para formar una nueva especie de DNA: DNA recombinante

La posibilidad de hidrolizar selectivamente una población de moléculas de DNA con una batería de endonucleasas de restricción condujo al desarrollo de una técnica para unir dos moléculas de DNA diferentes, denominada **DNA recombinante**. Esta técnica, combinada con diferentes técnicas para la replicación, separación e identificación, permite la producción de grandes cantidades de fragmentos de DNA purificados. Este conjunto de técnicas, denominadas tecnologías del DNA recombinante, permite el aislamiento de un trozo de DNA a partir de una molécula compleja mayor, tal como el genoma de un virus o el de los humanos, y su amplificación. Se han preparado así moléculas de DNA recombinante a partir de fragmentos de DNA de bacterias combinados con fragmentos de DNA humano, de virus con virus, y así sucesivamente. La unión de dos trozos de DNA diferentes por sitios específicos dentro de las moléculas se consigue con dos enzimas, una endonucleasa de restricción y una

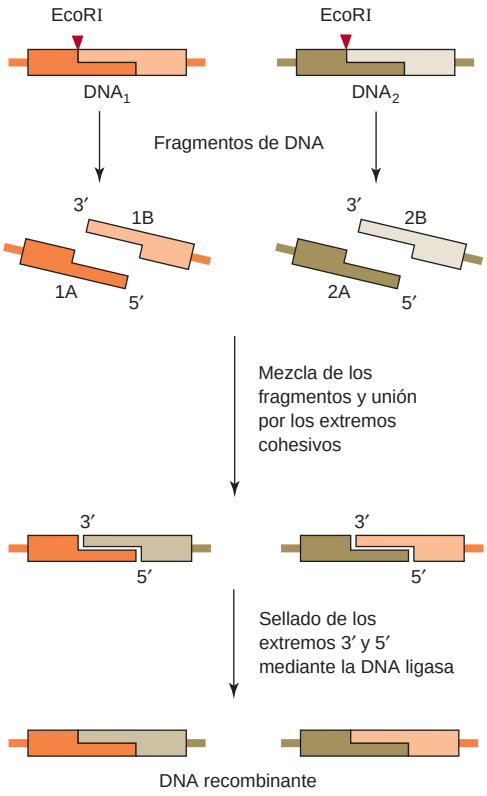


FIGURA 7.6
Obtención de DNA recombinante a partir de fragmentos preparados con endonucleasas de restricción que contienen extremos cohesivos.
Muchas endonucleasas de restricción hidrolizan el DNA de forma indentada, lo que da lugar a fragmentos con regiones de cadena sencilla en sus extremos 5′ y 3′. Los fragmentos de DNA obtenidos con la misma endonucleasa de restricción a partir de moléculas distintas presentan extremos de cadena sencilla complementarios que pueden asociarse por complementariedad y unirse covalentemente entre sí con una DNA ligasa. En una mezcla son posibles todas las combinaciones. Cuando se combinan dos fragmentos de DNA de origen distinto, el resultado es una molécula de DNA recombinante.

DNA ligasa. Pueden utilizarse muchas endonucleasas de restricción diferentes, que varían en la secuencia nucleotídica específicamente reconocida (Sección 7.3). Algunas hidrolizan las dos cadenas de DNA de forma escalonada y producen **extremos "pegajosos o cohesivos"** (Figura 7.6), mientras que otras cortan ambas cadenas simétricamente y producen un **extremo romo**. Un enzima de restricción específico corta el DNA exactamente por la misma secuencia de nucleótidos, independientemente del origen del DNA (bacteria, vegetal, mamífero, etc). Una molécula de DNA puede tener uno, varios, cientos, miles o ningún sitio de reconocimiento para una determinada endonucleasa de restricción. El corte escalonado da como resultado una molécula de DNA con extremos de cadena simple. Cuando se mezclan fragmentos de DNA diferentes generados por la misma endonucleasa de restricción, sus extremos de cadena simple pueden hibridar, es decir, aparearse. En presencia de DNA ligasa, los dos fragmentos se conectan covalentemente, para formar una molécula de DNA recombinante.

Los fragmentos de DNA producidos por endonucleasas de restricción que forman extremos romos también pueden ligarse, aunque de manera mucho menos eficiente. La eficiencia puede incrementarse añadiendo enzimáticamente una cola de poli(dA) a una especie de DNA, y otra de poli(dT) a los extremos de la segunda especie de DNA. Los fragmentos de DNA con colas complementarias pueden hibridarse y ligarse de la misma manera que los fragmentos con extremos cohesivos.

Mediante clonación pueden obtenerse cantidades importantes de vectores de DNA recombinante

La síntesis de un DNA recombinante abre el camino para la producción de cantidades importantes de fragmentos de DNA. Mediante la incorporación de un DNA recombinante a un sistema celular que permita la replicación del DNA recombinante, puede conseguirse la amplificación del DNA. Para ello se utiliza un DNA portador, denominado **vector de clonación**. Los plásmidos bacterianos son ideales como vectores de DNA recombinante.

Muchas bacterias contienen un único cromosoma circular de aproximadamente 4 millones de pares de bases y moléculas de DNA minicircular denominadas **plásmidos**. Los plásmidos están compuestos normalmente sólo por unos pocos miles de

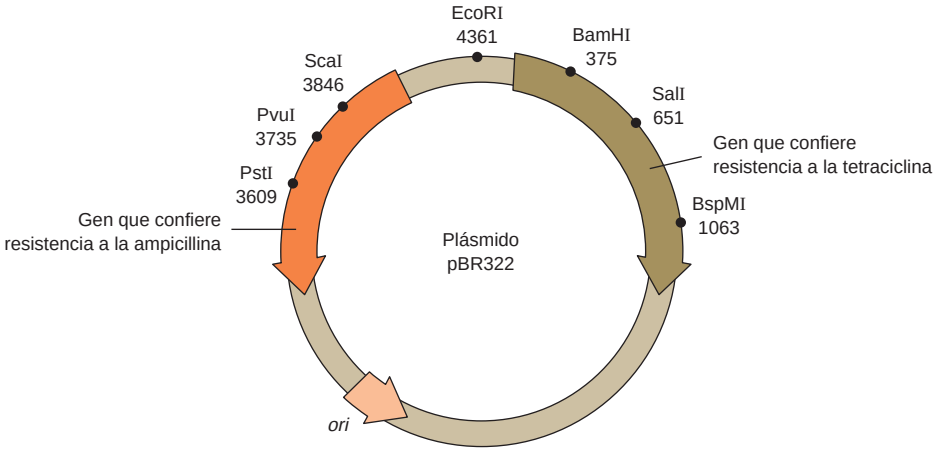


FIGURA 7.7
El plásmido pBR322 construido en el laboratorio contiene características que facilitan la clonación de fragmentos de DNA foráneo.
Por convención, la numeración de los nucleótidos comienza en la primera T de la única secuencia de reconocimiento de EcoRI (GAATTC), y las posiciones en el mapa se refieren a la base en posición 5′ de las diferentes secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. Sólo se muestran algunos de los sitios de restricción únicos contenidos en los genes de resistencia a antibiótico, y ninguno de los numerosos sitios en los que un enzima corta más de una vez dentro del plásmido.

pares de bases, y raramente están asociados con la gran molécula cromosómica. Los genes contenidos en el plásmido cumplen varias funciones; entre ellas, la capacidad de conferir a la bacteria resistencia a los antibióticos, una característica útil para la selección de colonias específicas de la bacteria. Los plásmidos se replican independientemente de la replicación del cromosoma bacteriano principal. Un tipo de plásmidos, los plásmidos de **control relajado**, pueden estar presentes desde decenas a cientos de copias por bacteria, y la replicación depende solamente de los enzimas de la célula huésped, de larga vida media. Por lo tanto, la replicación de los **plásmidos "relajados"** puede producirse en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas. En estas condiciones, las bacterias pueden acumular varios millares de copias del plásmido por célula. Otros tipos de plásmido están sujetos a **control estricto** y su replicación depende de la síntesis continua de proteínas codificadas en el plásmido. Estos plásmidos se replican aproximadamente a la misma velocidad que el cromosoma bacteriano, y sólo se encuentra un bajo número de copias por célula. Los plásmidos relajados se utilizan rutinariamente en estudios de recombinación.

El primer DNA recombinante útil que logró clonarse fue fruto de la ligación de un DNA foráneo con un vector, el **plásmido pSC101** de *E. coli*, que contiene un único sitio para la endonucleasa de restricción EcoRI y un gen que codifica una proteína que confiere a la bacteria resistencia a un antibiótico. Este plásmido contiene un origen de replicación y secuencias de DNA reguladoras asociadas, que en conjunto se conocen como un **replicón**. Sin embargo, este vector presenta numerosas limitaciones. El sitio de restricción único limita los fragmentos de DNA que pueden clonarse a aquellos que hayan sido generados por EcoRI y la resistencia a un antibiótico como único marcador seleccionable reduce su utilidad; además, se replica con dificultad.

Mediante la tecnología del DNA recombinante, se han construido vectores plasmídicos de gran versatilidad. Las características deseables de un vector plasmídico son: un tamaño relativamente pequeño (3–5 kb) para poder acomodar fragmentos más grandes; varios sitios de restricción diferentes para la clonación de una amplia variedad de fragmentos; múltiples marcadores seleccionables para facilitar la selección de bacterias con moléculas de DNA recombinante; y elevada velocidad de replicación. El primer plásmido que se construyó (Figura 7.7) para satisfacer estos requerimientos fue el **pBR322**, que se ha utilizado como base para la construcción de nuevos vectores actualmente en uso. La mayoría de los vectores habitualmente utilizados contiene una secuencia de DNA insertado denominada **"conector múltiple", banco de sitios de restricción** o **múltiples sitios de clonación,** que es una región de DNA consistente en un grupo de numerosos sitios de restricción únicos en el plásmido.

Clonación direccional: inserción de DNA en un vector con una orientación específica

La **clonación direccional** disminuye el número de "recombinantes" variables y aumenta la probabilidad de seleccionar el recombinante deseado. La inserción de un fragmento de DNA foráneo con una polaridad definida en un vector plasmídico, sin que éste último se recircularice, puede conseguirse utilizando dos endonucleasas de

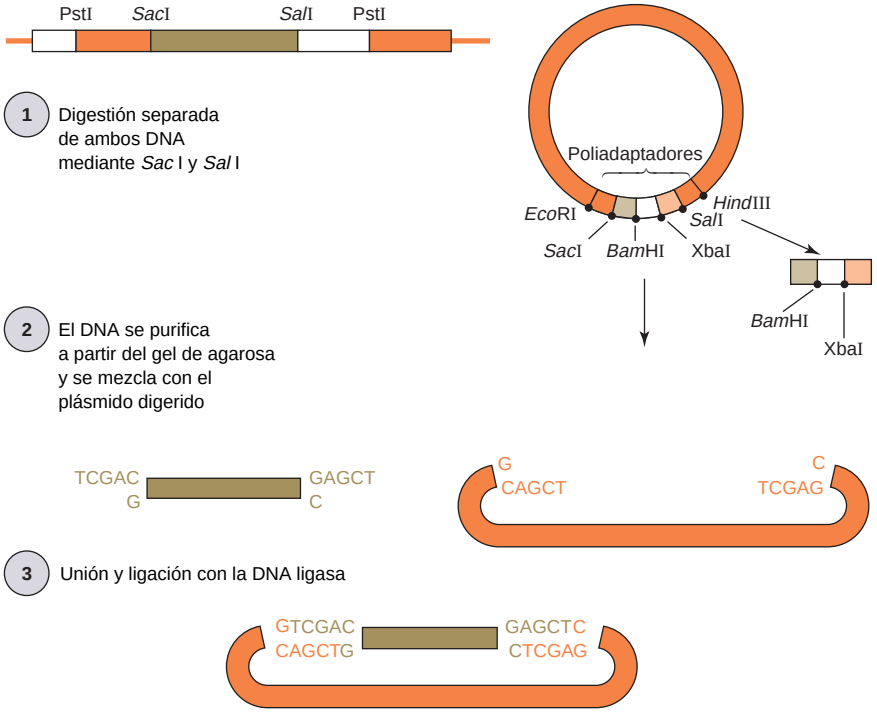


FIGURA 7.8
Clonación direccional de DNA foráneo en vectores con una orientación determinada. La inserción de un fragmento de DNA foráneo en un vector con una orientación determinada requiere dos secuencias diferentes en cada extremo del fragmento y las secuencias complementarias correspondientes generadas en los extremos del vector. Un "poliadaptador" con numerosos sitios de endonucleasas de restricción únicos dentro del vector facilita la clonación direccional. El conocimiento del mapa de restricción del DNA de interés permite seleccionar las endonucleasas de restricción adecuadas para generar fragmentos de DNA específicos que puedan clonarse en un vector.

restricción para cortar los plásmidos (Figura 7.8); los vectores con múltiples sitios de clonación son apropiados para este propósito. La utilización de dos enzimas da fragmentos de DNA y plásmidos lineales con extremos "cohesivos" diferentes. En estas condiciones, el plásmido no puede unirse consigo mismo. Además, el DNA foráneo sólo puede insertarse en el vector en una sola orientación. Este es un punto extremadamente importante cuando se clona en vectores de expresión un gen potencialmente funcional del lado 3′ de los elementos reguladores del promotor (véase p. 305).

Las bacterias se pueden transformar con DNA recombinante

Se denomina **transformación** al proceso mediante el cual se introduce artificialmente DNA en bacterias. Esto se consigue exponiendo brevemente las células a cationes divalentes que las hacen transitoriamente permeables a moléculas de DNA pequeñas. Las moléculas de plásmidos recombinantes que contienen DNA foráneo pueden introducirse en bacterias, donde se replicarán normalmente.

Selección de las bacterias transformadas

Una vez un plásmido ha sido introducido en una bacteria, ambos pueden replicarse. Existen métodos para seleccionar las bacterias portadoras de moléculas de DNA recombinante. En el proceso recombinante, algunas bacterias pueden no ser transformadas o serlo con un vector que no lleve DNA foráneo, porque éste se haya unido consigo mismo sin incorporar el DNA foráneo. En algunas condiciones experimentales se generan fragmentos de restricción que pueden purificarse fácilmente. Dichos

fragmentos pueden obtenerse a partir de especies pequeñas de DNA muy puras, como, por ejemplo, algunos DNA víricos. Sin embargo, es mucho más frecuente que una sola endonucleasa de restricción genere desde cientos a cientos de miles de fragmentos en función del tamaño y complejidad del DNA en estudio. A partir de este tipo de muestras no es posible aislar fragmentos individuales para ser introducidos posteriormente también de forma individual en el plásmido. Por lo tanto, se han desarrollado métodos para seleccionar aquellas bacterias que contienen el DNA deseado.

Las endonucleasas de restricción no hidrolizan necesariamente el DNA en fragmentos que contengan los genes intactos. Si el fragmento contiene un gen entero, probablemente no contenga las secuencias reguladoras flanqueantes requeridas, tales como la región promotora. Además, si el gen foráneo es de mamífero, sus secuencias reguladoras no serán reconocidas por la maquinaria sintética de la bacteria. El transcrito génico primario (pre-mRNA) puede contener intrones que la bacteria no puede eliminar.

Moléculas de DNA recombinante en una genoteca

Cuando una mezcla compleja de miles de genes diferentes, dispuestos en cromosomas diferentes, como en el caso del genoma humano, se somete a hidrólisis con una sola endonucleasa de restricción, se generan miles de fragmentos de DNA. Estos fragmentos de DNA se hibridan con un plásmido vector que se ha linealizado por corte con la misma endonucleasa de restricción. Ajustando la proporción entre plásmido y DNA foráneo, la probabilidad de unir al menos una copia de cada fragmento de DNA con un DNA plasmídico recombinante ciclado se aproxima a uno. Normalmente, en cada plásmido vector sólo se inserta uno de los múltiples fragmentos de DNA. Con las moléculas recombinantes, las bacterias se transforman de modo que una bacteria individual sólo incorpora un único plásmido. La molécula recombinante puede ahora replicarse dentro de la bacteria, que a su vez se reproduce; cada bacateria será portadora de múltiples copias del DNA recombinante. La población total de bacterias contendrá fragmentos de DNA que pueden representar el genoma humano entero. Este conjunto se denomina **genoteca**. Como en cualquier biblioteca que contenga miles de volúmenes, ha de disponerse de un sistema de selección para recuperar el libro o gen de interés.

Los plásmidos son utilizados comúnmente para clonar fragmenos de DNA obtenidos a partir de moléculas de tamaño y complejidad limitados, tales como los virus, y para subclonar fragmentos grandes de DNA previamente clonados en otros vectores. Los fragmentos de DNA genómico se clonan normalmente a partir de otros vectores capaces de incorporar fragmentos de DNA foráneo más grandes que los plásmidos (véase p. 307).

La PCR hace innecesaria la clonación de DNA

El DNA clonado y amplificado en un vector puede utilizarse para secuenciación, mutagénesis o la simple subclonación. La PCR ha permitido en muchos casos evitar la amplificación del DNA mediante un sistema biológico de replicación, reduciendo así el tiempo y los pasos que se requieren para su preparación. Además, no es preciso conocer la secuencia del DNA insertado (hasta 6 kb) para amplificarlo, ya que conocemos la secuencia del vector que flanquea el inserto.

En algunos casos la PCR elimina completamente la necesidad de clonar el DNA de interés. Por ejemplo, un gen que previamente haya sido clonado y secuenciado puede ser analizado rápidamente en el DNA de un paciente para la detección de mutaciones en el mismo mediante una **estrategia de PCR múltiple**. El DNA se aísla a partir de las células sanguíneas del paciente y se sintetizan múltiples parejas de cebadores oligonucleotídicos para amplificar el gen entero o regiones seleccionadas dentro del mismo (Figura 7.9). El análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA amplificados permite detectar cualquier mutación por deleción potencial en comparación con los productos génicos normales. La secuenciación directa de múltiples productos de la PCR puede utilizarse para detectar mutaciones puntuales en el gen del paciente. La PCR múltiple se ha utilizado para detectar varios defectos en el gen de la *HGPRTasa* en pacientes con la enfermedad de Lesch–Nyhan (véase la Apli. Clín. 7.4).

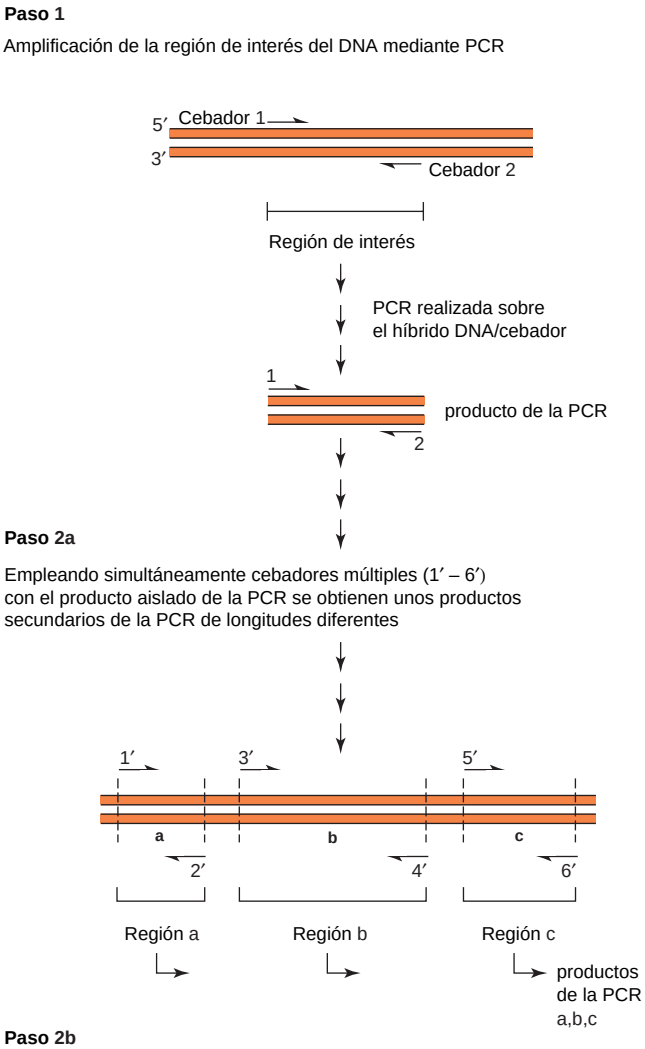
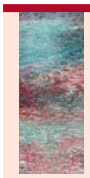


FIGURA 7.9
Estrategia de PCR múltiple para determinar la presencia de mutaciones en una región del DNA.
Una región dentro de una molécula compleja de DNA de cualquier origen puede ser amplificada por PCR con cebadores específicos complementarios de secuencias que flanqueen la región objeto de estudio (paso 1). Después de múltiples ciclos de PCR, el DNA amplificado (producto de la PCR) puede utilizarse como molde con múltiples parejas de cebadores (paso 2a) que son complementarios de diferentes lugares del DNA (en la figura cubren los segmentos a, b y c). Este procedimiento requiere un conocimiento previo de la secuencia del DNA o del gen normal. El paso 2a se repite con el DNA del paciente portador potencial de una mutación o de mutaciones en la región objeto de estudio (paso 2b). Los productos amplificados por PCR múltiple (pasos 2a y 2b) se analizan por electroforesis en gel de agarosa para averiguar si la muestra del paciente contiene alguna mutación (paso 3).



APLICACIÓN CLÍNICA 7.4

Análisis por PCR múltiple de los defectos del gen de la *HGPRTasa* en el síndrome de Lesch–Nyhan

El síndrome de Lesch–Nyhan, descrito en la Apli. Clín. 19.2, es el resultado de una deficiencia en la actividad del enzima hipoxantina–guanina fosforribosil transferasa (HGPRTasa). Se han detectado varias formas defectuosas de HGPRTasa. Se ha empleado la amplificación por PCR múltiple del locus del gen *HGPRT* para el análisis de células pertenecientes a pacientes con este síndrome. Los resultados apoyan la variabilidad de la HGPRTasa. El gen, que comprende 9 exones, puede ser amplificado por PCR múltiple empleando 16 cebadores distintos en una sola reacción de PCR. Los productos pueden separarse mediante electroforesis en gel de agarosa. El análisis del locus del gen *HGPRT* mediante amplificación múltiple del DNA procedente de varios pacientes puso de manifiesto una gran variabilidad causada por deleciones en diferentes exones, o incluso por una ausencia total de exones.

Rossiter, B. J. F., et al. En: M. J. McPherson, P. Quirke, y G. R. Taylor (Eds.), *PCR. A Practical Approach,* Vol. 1. Oxford, England: Oxford University Press, 1994, p. 67.

7.6 SELECCIÓN DE UN DNA ESPECÍFICO CLONADO EN LAS GENOTECAS

Selección de bacterias transformadas aprovechando la pérdida de resistencia a antibióticos

Cuando se multiplica una bacteria individual transformada que lleva una molécula recombinante, toda su descendencia es genéticamente idéntica y lleva copias del mismo plásmido recombinante. Se ha amplificado el DNA foráneo a partir de un solo fragmento de DNA clonado. El problema es cómo identificar la colonia que contiene el plásmido deseado entre miles o millones de colonias bacterianas diferentes. El plásmido **pBR322** y sus derivados, construidos en el laboratorio, tienen dos genes que confieren resistencia a antibióticos. Dentro de estos genes de resistencia a antibiótico hay secuencias de DNA que pueden ser cortadas por endonucleasas de restricción. Cuando se inserta un fragmento de DNA foráneo en un sitio de restricción contenido dentro de un gen de resistencia al antibiótico, el gen deja de ser funcional. Las bacterias que llevan este plásmido recombinante serán sensibles al antibiótico (Figura 7.10). Sin embargo, el segundo gen de resistencia a antibiótico presente en el plásmido permanece intacto, por lo que las bacterias serán resistentes a este antibiótico. Esta técnica de **inactivación por inserción** de productos génicos del plásmido permite seleccionar las bacterias portadoras de plásmidos recombinantes.

pBR322 contiene genes que confieren resistencia a **ampicilina** (*amp*^{r}) y **tetraciclina** (*tet*^{r}). Una genoteca con fragmentos de DNA celular insertados dentro del gen *tet*^{r} puede seleccionarse y rastrearse en dos etapas (Figura 7.10). En la primera, se permite el crecimiento de las bacterias en un medio que contiene ampicilina. Las bacterias no transformadas por el plásmido (carecen de plásmido normal o recombinante) durante la construcción de la genoteca no crecerán en presencia del antibiótico, y esta población de bacterias será eliminada. Sin embargo, todavía no es posible distinguir las bacterias viables que llevan un plásmido recombinante de las que llevan un plásmido vector, es decir, un plásmido sin inserto de DNA. La segunda etapa consiste en identificar las bacterias portadoras de plásmidos recombinantes con genes *tet*^{r} no funcionales, que son, por consiguiente, sensibles a tetraciclina.

Las bacterias insensibles a ampicilina se inoculan y se dejan crecer en placas de agar en presencia de ampicilina (Figura 7.10). Pueden obtenerse réplicas de las placas poniendo un filtro en contacto con las colonias de la placa original, y luego poniendo el filtro en contacto con placas estériles adicionales. Todas las placas contendrán porciones de cada colonia original en posiciones idénticas identificables sobre la placa. La placa réplica puede contener tetraciclina, que no permitirá el crecimiento de las bacterias portadoras de plásmidos recombinantes con su gen *tet*^{r} interrumpido. La comparación de las réplicas en placa con y sin tetraciclina indicará qué colonias contienen plásmidos recombinantes en las placas de ampicilina originales. Así, pueden seleccionarse, cultivarse y analizarse colonias individuales que contengan DNA recombinante.

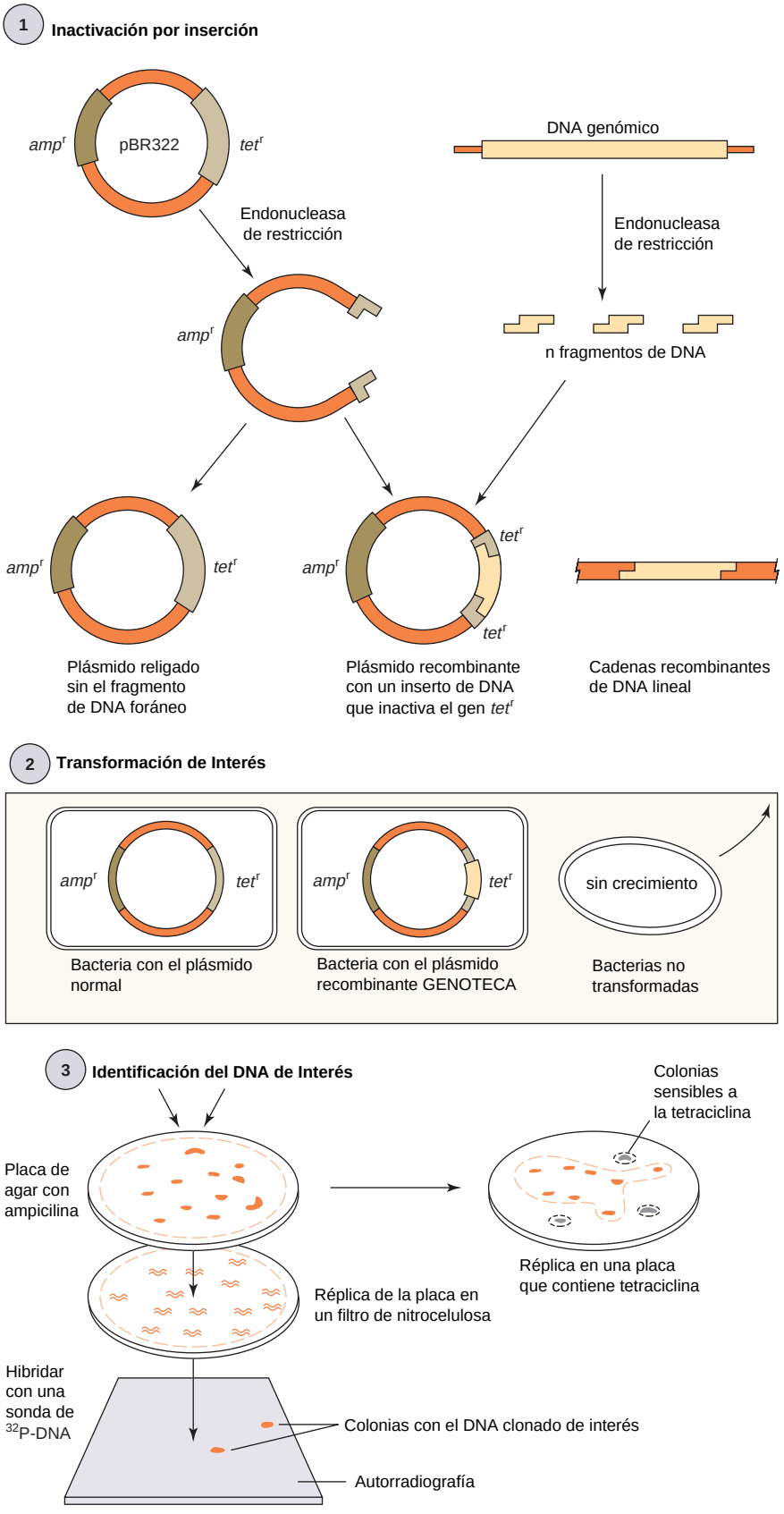


FIGURA 7.10
Inactivación por inserción de plásmidos recombinantes y detección de bacterias transformadas que contienen el DNA clonado. Cuando la inserción de un fragmento de DNA foráneo en un vector interrumpe la secuencia de un gen funcional, el DNA recombinante resultante no expresa el gen. El gen que codifica la resistencia al antibiótico tetraciclina (*tet*^{r}) se destruye por inserción de DNA, mientras que el gen de resistencia a la ampicilina (*amp*^{r}) permanece funcional. La destrucción de uno de los genes de resistencia a un antibiótico y el mantenimiento de un segundo gen de resistencia a otro antibiótico permite la detección de colonias bacterianas que tienen el DNA foráneo situado dentro del vector recombinante en replicación.

Para identificar el DNA buscado pueden utilizarse tanto sondas de DNA como de RNA (véanse las pp. 44 y 296). Las colonias bacterianas resistentes a ampicilina sobre agar pueden replicarse sobre un filtro de nitrocelulosa, y las células adheridas a partir de cada colonia pueden lisarse con NaOH (Figura 7.10). El DNA de las células lisadas también se desnaturaliza con el NaOH y se une firmemente al filtro. Una sonda de DNA o RNA marcada, complementaria del DNA buscado, puede hibridarse con el DNA unido a la nitrocelulosa. El filtro se expone a autorradiografía con film de rayos X. Toda colonia portadora del DNA clonado buscado dará una señal visible sobre la película de rayos X. Estas manchas se harán corresponder con la colonia de la placa de agar original, que podrá entonces cultivarse a gran escala para su manipulación posterior.

Normalmente, estos fragmentos de DNA clonados y amplificados no contienen un gen completo, por lo tanto, no se expresan. Sin embargo, pueden purificarse fácilmente los insertos de DNA para secuenciación, o utilizarse como sondas para la detección de genes en una mezcla de DNA genómico, para estudiar niveles de transcripción de mRNA y para detectar mutaciones causantes de enfermedades.

La complementación-α en la selección de bacterias portadoras de plásmidos recombinantes

Se dispone de otras técnicas de selección para identificar bacterias portadoras de moléculas de DNA recombinante. Se han construido vectores (la serie pUC) con los cuales las bacterias transformadas con estos vectores portadores de insertos de DNA foráneo puedan identificarse visualmente (Figura 7.11). Los plásmidos pUC contienen las secuencias reguladoras y un fragmento del extremo 5′ de la secuencia codificadora (146 amino-ácidos del extremo N-terminal) del gen de la β-galactosidasa (gen *lacZ*) del operón *lac* (véase la p. 332). El fragmento traducido N-terminal de 146 aminoácidos de la β-galactosidasa es un polipéptido inactivo. Cepas de *E. coli* mutantes, que codifican la parte carboxi-terminal perdida de la β-galactosidasa, pueden ser transformadas con los plásmidos pUC. Los fragmentos traducidos de β-galactosidasa codifi-

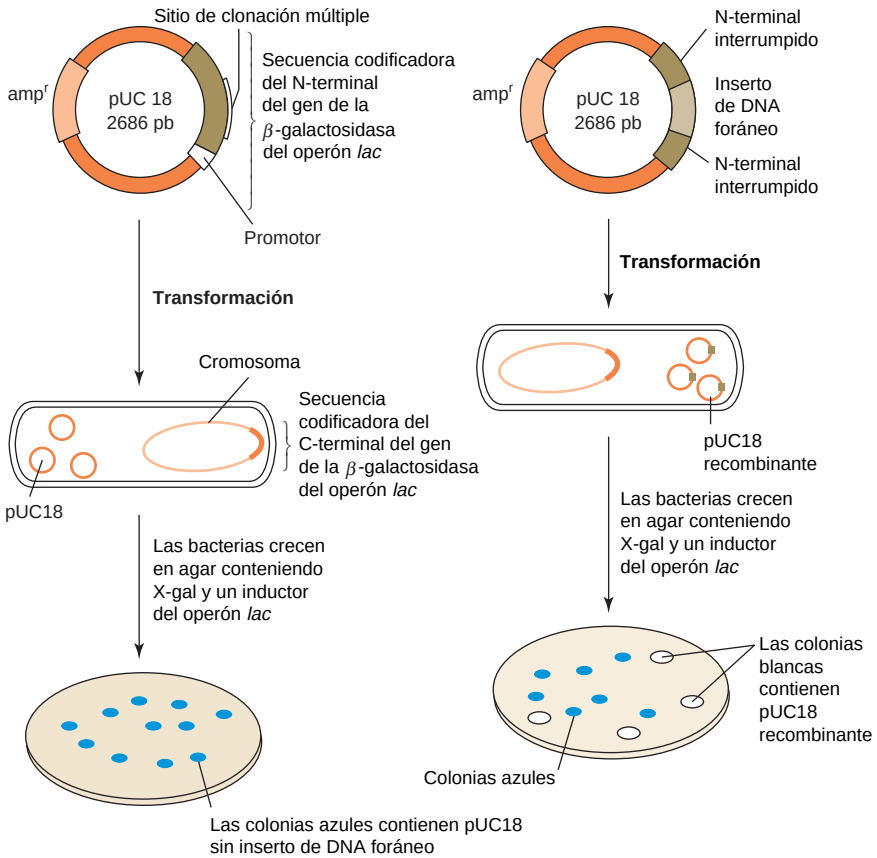


FIGURA 7.11
Complementación-α para la detección de bacterias transformadas.
Se ha construido un vector (pUC 18) que expresa la secuencia codificadora del extremo N-terminal del enzima β-galactosidasa del operón *lac*. Mutantes bacterianos que codifican la parte C-terminal de la β-galactosidasa son transformados con pUC 18. Estas bacterias transformadas, al crecer en presencia de un sustrato especial para el enzima intacto (X-gal), dan colonias azules, ya que contienen el enzima que reacciona con el sustrato. Las secuencias génicas que codifican los extremos N-terminal y C-terminal funcionales se complementan entre sí para dar un enzima funcional. Sin embargo, si un inserto de DNA foráneo rompe la secuencia que codifica el extremo N-terminal de la β-galactosidasa en el pUC 18, las bacterias transformadas con esta molécula recombinante no producen un enzima funcional. Las colonias bacterianas que llevan estos vectores recombinantes son detectadas visualmente como colonias blancas.

cados en la célula huésped y en el plásmido en respuesta a un inductor, **el isopropiltio-β-D-galactósido**, se complementan mutuamente, dando lugar a un enzima activo. El proceso se conoce como **complementación-α**. Cuando las bacterias transformadas crecen en presencia de un sustrato cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido[X-gal]) de la β-galactosidasa, forman colonias azules. Sin embargo, si en las secuencias de bases de la parte N-terminal de la β-galactosidasa se inserta un fragmento de DNA foráneo, no puede formarse el enzima activo. Las bacterias, transformadas con estos plásmidos recombinantes y crecidas sobre X-gal, darán colonias blancas, que se pueden diferenciar visualmente de las colonias azules no transformadas.

7.7 | TÉCNICAS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A DNA

Los ácidos nucleicos pueden utilizarse como sondas para la detección de secuencias específicas de DNA y RNA

La selección de bacterias portadoras de moléculas de DNA recombinante, el análisis de mRNA expresados en una célula, o la identificación de secuencias de DNA en un genoma requieren métodos de detección sensibles y específicos. Las **sondas** de DNA y RNA satisfacen estos requisitos. Estas sondas contienen secuencias de nucleótidos complementarias del ácido nucleico diana, e hibridan con el ácido nucleico buscado. El grado de complementariedad de una sonda con el DNA sujeto a investigación determina la fuerza de unión de la sonda. No es necesario que la sonda contenga toda la secuencia complementaria del DNA. La sonda, RNA o DNA, se marca habitualmente con ^{32}P, aunque también se utilizan marcajes no radiactivos basados en sustratos enzimáticos acoplados a nucleótidos, de manera que cuando éstos se incorporan al ácido nucleico, pueden detectarse mediante una reacción catalizada enzimáticamente.

Pueden obtenerse sondas marcadas mediante **desplazamiento de la mella** de DNA de cadena doble. El desplazamiento de la mella (Figura 7.12) implica la hidrólisis enzimática al azar de un enlace fosfodiéster en una cadena de DNA por la DNasa I; las roturas enzimáticas en el esqueleto del DNA se denominan mellas. Un segundo enzima, la DNA polimerasa I de *E. coli*, con su actividad exonucleolítica 5′ → 3′ y su actividad DNA polimerasa, crea huecos de cadena simple (en una sola cadena) como resultado de la hidrólisis de nucleótidos desde el lado 5′ de la mella, y, a continuación, rellena los huecos con su actividad polimerasa. La reacción de la polimerasa se lleva normalmente a cabo en presencia de un desoxinucleósido trifosfato marcado en posición α con ^{32}P y tres desoxinucleósidos trifosfato no marcados. El DNA utilizado en este método normalmente se purifica y se obtiene de DNA clonado, DNA vírico o cDNA.

Otro método utilizado para marcar sondas de DNA es el **cebado al azar**, que tiene ciertas ventajas respecto al método de desplazamiento de la mella. El uso de cebadores al azar requiere tan solo 25 ng de DNA, en contraposición a los 1–2 μg usados en el desplazamiento de la mella, y produce sondas con actividades específicas ($>10^9$ cpm μg^{-1}) 10 veces superiores. Este método produce generalmente sondas de DNA marcado de mayor longitud. El DNA de doble cadena se desnaturaliza y se hibrida con una mezcla de hexanucleótidos al azar, que contienen todas las secuencias posibles (ACTCGG, ACTCGA, ACTCGC, etc.). Los hexanucleótidos hibridados sirven de cebadores para la síntesis del DNA mediante una DNA polimerasa, como el enzima Klenow, en presencia de uno o más desoxirribonucleósidos trifosfato marcados.

Las **sondas de RNA** marcadas presentan ventajas sobre las sondas de DNA. Por un lado, a partir de un molde, que puede estar disponible en cantidad muy limitada, pueden transcribirse cantidades relativamente grandes de RNA. Una sonda de DNA de cadena doble (dsDNA) ha de desnaturalizarse antes de la hibridación con el DNA diana, y la rehibridación consigo mismo compite con la hibridación con el DNA de interés. Esta competición no se da con las sondas de cadena sencilla de RNA que hibridan con moléculas complementarias de DNA o RNA. La síntesis de una sonda de RNA necesita un molde de DNA. Para transcribir el DNA molde, éste ha de unirse covalentemente a un promotor situado más arriba que pueda ser reconocido por una RNA polimerasa dependiente de DNA. Se han construido vectores apropiados para esta técnica.

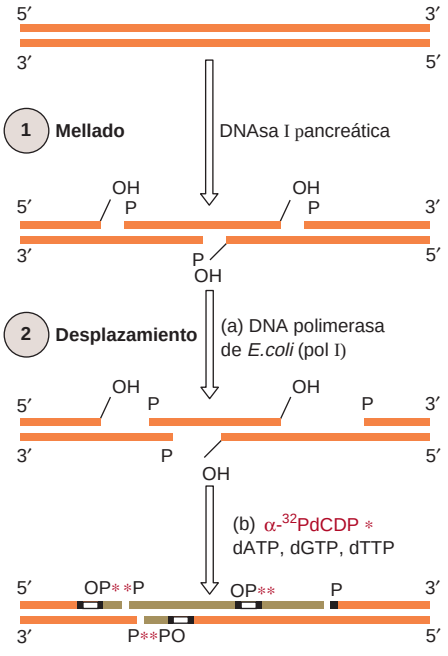


FIGURA 7.12
Método del desplazamiento de la mella para marcar sondas de DNA.
Las moléculas del DNA purificado pueden marcarse radiactivamente y utilizarse para detectar, mediante hibridación, la presencia de DNA o RNA complementario en muestras experimentales. (1) Paso de mellado: se introducen cortes monohebra al azar en el DNA. (2) Paso de desplazamiento: la DNA polimerasa (pol I) de *E. coli* tiene (*a*) una actividad exonucleasa 5′ → 3′ que elimina los nucleótidos a partir del extremo 5′ de la mella; y (*b*) una actividad polimerasa que simultáneamente va rellenando el hueco de cadena sencilla con nucleótidos marcados utilizando el extremo 3′ como cebador.

Una sonda de DNA o RNA marcada puede hibridarse con ácidos nucleicos unidos a filtros de nitrocelulosa e identificarse mediante la detección de la sonda marcada. Los ácidos nucleicos de interés pueden transferirse a la nitrocelulosa desde colonias bacterianas crecidas sobre agar o desde geles de agarosa donde los ácidos nucleicos hayan sido separados electroforéticamente en función de su tamaño.

La técnica de transferencia Southern para la identificación de fragmentos de DNA

En los años 70 se desarrolló una técnica para transferir especies de DNA, separadas por electroforesis en gel de agarosa, a un filtro para su posterior análisis. Está técnica se ha convertido en una herramienta indispensable en biología molecular. El método, desarrollado por E. M. Southern, se conoce como **transferencia Southern** (Figura 7.13). Mediante electroforesis en gel de agarosa es posible separar según su tamaño

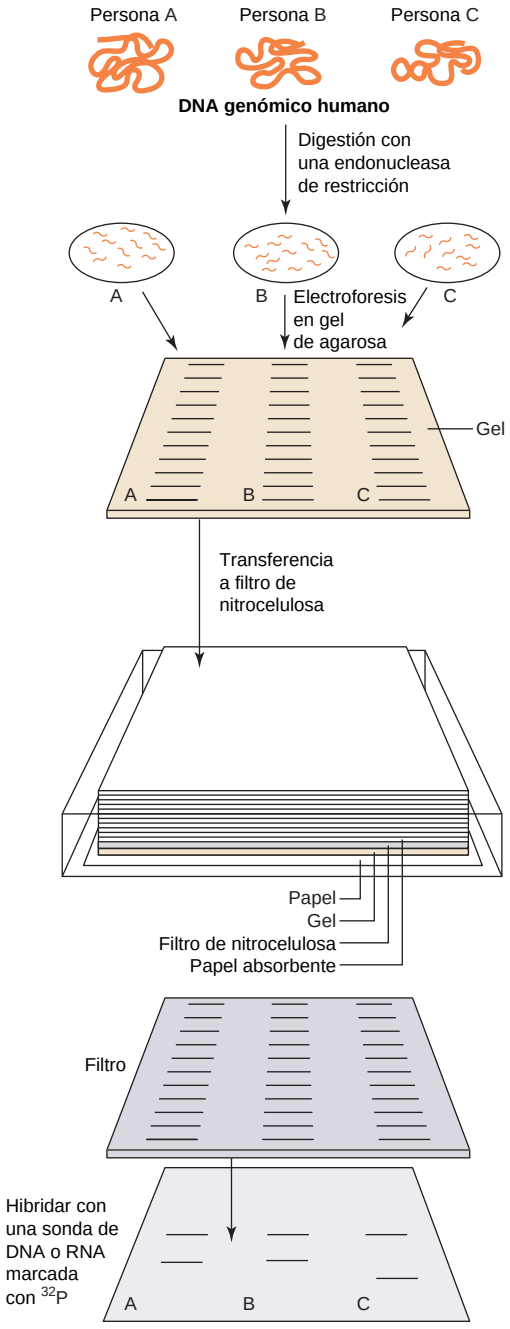


FIGURA 7.13
Transferencia Southern del DNA desde geles de agarosa a nitrocelulosa. La transferencia del DNA en forma de moléculas de cadena sencilla a nitrocelulosa permite la detección de secuencias específicas dentro de una mezcla compleja de DNA. La hibridación con sondas de DNA marcadas mediante desplazamiento de la mella puede mostrar si una secuencia determinada de DNA se presenta en una o en varias regiones del genoma.

mezclas de DNA compuestas por fragmentos discretos generados por endonucleasas de restricción, independientemente de su origen y su complejidad. El DNA se desnaturaliza sumergiendo el gel en álcali. A continuación, se coloca el gel sobre papel absorbente, y sobre la parte superior del gel se coloca directamente un filtro de nitrocelulosa. Sobre el filtro de nitrocelulosa se colocan varias capas de papel absorbente. El papel absorbente debajo del gel se mantiene húmedo con una disolución salina concentrada que por capilaridad fluye hacia arriba a través del gel, la nitrocelulosa y las capas superiores de papel absorbente. El DNA, es eluido del gel por el flujo ascendente de la disolución salina hacia el filtro de nitrocelulosa situado directamente encima de éste, donde queda retenido. La posición del DNA unido al filtro de nitrocelulosa es exactamente la misma que tenía en el gel de agarosa. En su forma de cadena simple unida a la membrana, el DNA puede analizarse con sondas marcadas.

La técnica de transferencia Southern es una herramienta muy valiosa en los procedimientos analíticos para detectar la presencia de secuencias específicas en un DNA genómico complejo y conocer el número de copias de una determinada secuencia, en la confirmación de resultados de clonación de DNA y en la demostración de polimorfismos en el DNA del genoma humano que correspondan a estados patológicos. En la Figura 7.13 se muestra un ejemplo de la utilización de la transferencia Southern. En este ejemplo, DNA genómico humano entero, aislado de tres individuos, fue digerido con una endonucleasa de restricción, generando miles de fragmentos. Estos fragmentos se distribuyeron según su tamaño a lo largo del gel de agarosa en un campo eléctrico. El DNA fue transferido a un filtro de nitrocelulosa y se hibridó con una sonda de DNA o RNA marcada con ^{32}P que representa una parte de un gen estudiado. La sonda detectó dos bandas en los tres individuos, indicando que el gen de interés había sido cortado en un sitio dentro de su secuencia. Los individuos A y B presentaban un patrón normal, mientras que el paciente C tenía una banda normal y una banda con un tamaño molecular menor. Este es un ejemplo de DNA modificado dentro de diferentes individuos de la misma especie, que se manifiesta como un **polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)**, y que implica una deleción de un segmento del gen que puede asociarse con un estado patológico. El gen de este paciente puede clonarse, secuenciarse y analizarse completamente a fin de caracterizar la alteración en el DNA (véase la Apli. Clín. 7.5).

Otras técnicas que utilizan los principios de la transferencia Southern son la transferencia de RNA (transferencia Northern), descrita más adelante, y de proteínas (transferencia Western) a filtros de nitrocelulosa o a membranas de nylon.

Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla

El analisis de transferencia Southern y la detección de cambios en bases del DNA de diferentes individuos mediante el análisis de RFLP depende de la alteración de una secuencia correspondiente a la diana de una endonucleasa de restricción. Raramente, una sustitución de base, una deleción o una inserción ocurren en el interior de una diana de una endonucleasa de restricción. No obstante, estas modificaciones pueden detectarse fácilmente mediante el análisis de **polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP)**. Esta técnica se basa en que el DNA monohebra, inferior a 400 bases, sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida tiene una movilidad dependiente en parte de su conformación. La alteración de una sola base normalmente modifica lo suficiente la conformación del DNA como para que sea detectable un desplazamiento de la banda en electroforesis no desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

El análisis de SSCP puede realizarse con la amplificación por PCR para analizar pequeñas regiones amplificadas directamente del DNA genómico o del cDNA. Para ello se sintetizan dos oligonucleótidos cebadores que flanquean (con sentido y antisentido) la región de interés y el DNA se amplifica por PCR en presencia de nucleótidos marcados radiactivamente. El producto de la PCR, un DNA de doble hebra marcado, se desnaturaliza por calor en presencia de formamida al 80% e inmediatamente se procede a su análisis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Las movilidades de los productos de los pacientes se comparan con las de los controles a partir de sujetos normales. La detección de mutaciones en los pacientes puede permitir identificar lesiones genéticas. Estos métodos fueron aplicados con éxito al análisis de los genes relacionados con el sindrome del QT largo, que ha sido asociado con el síndrome infantil de la muerte súbita (SIDS) (véa-

APLICACIÓN CLÍNICA 7.5

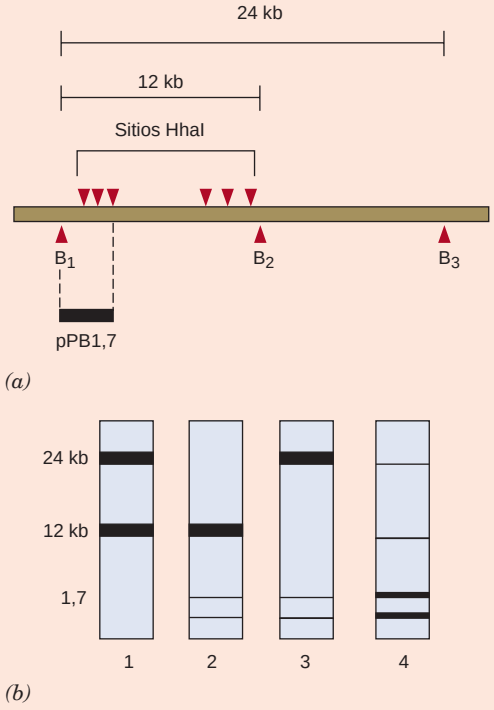
Los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción manifiestan el origen clonal de los tumores

Se acepta generalmente que la mayoría de los tumores tienen un origen monoclonal; es decir, un suceso improbable modifica el genoma de una sola célula somática, lo que hace que las células hijas crezcan anormalmente, formando una masa tumoral en la que todas las células llevan en su genoma la misma modificación. La prueba de si un tumor es de origen monoclonal o policlonal ayuda a distinguir entre hiperplasia (aumento en la producción y crecimiento de células normales) y neoplasia (crecimiento de células nuevas o tumorales). La detección de poliformismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de muestras de DNA en transferencias Southern permite determinar el origen clonal de los tumores humanos. Si las células tumorales hubieran derivado colectivamente de diferentes células parentales, deberían contener una mezcla de marcadores de DNA característicos de cada célula original. Sin embargo, un marcador de DNA idéntico en todas las células tumorales indicaría un origen monoclonal. El análisis se limita a las hembras, donde es posible aprovechar que cada célula tenga un sólo cromosoma X activo, indistintamente de origen paterno o materno, con el segundo cromosoma X inactivado. La activación ocurre al azar durante la embriogénesis, y se mantiene estable en todas la células hijas, la mitad de las células contienen un cromosoma X activo de origen materno y la otra mitad contienen un cromosoma X activo de origen paterno.

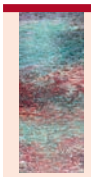
El análisis de la naturaleza clonal de un tumor humano se basa en el hecho de que en la activación de un cromosoma X tienen lugar cambios en la metilación de determinados residuos de citosina (C) de la molécula de DNA. Algunas endonucleasas de restricción, tal como la HhaI, que corta el DNA por sitios GCGC, no cortan el DNA por sus secuencias de reconocimiento si dentro del sitio hay una C metilada. Por lo tanto, con endonucleasas de restricción puede comprobarse el estado de metilación del cromosoma X (activado frente a inactivado). Además, en un número significativo de individuos el cromosoma X paterno puede distinguirse del cromosoma X materno mediante diferencias en la migración electroforética de fragmentos, generados por endonucleasas de restricción, procedentes de regiones específicas del cromosoma. Estos fragmentos de DNA se identifican en una transferencia Southern por hibridación con una sonda de DNA complementaria a esta región del cromosoma X. Un gen ligado al cromosoma X que puede estudiarse con estos métodos es el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa (*HGPRTasa*). El gen *HGPRTasa* presenta de forma estable dos sitios internos para endonucleasa de restricción BamHI (en la figura, B_1 y B_3), pero, en muchos individuos también existe un tercer sitio (B_2).

La presencia del sitio B_2 en uno solo de los HGPRT de los cromosomas X paternos permite la detección de polimorfismos generados por enzimas de restricción. Por consiguiente, una célula femenina puede tener un cromosoma X con el gen *HGPRT* con dos sitios BamHI (se detecta entonces un solo fragmento de DNA de 24 kb) o tres sitios BamHI (que da lugar a un solo fragmento de DNA detectable de 12 kb). La figura muestra los resultados del análisis del DNA procedente de una célula tumoral para determinar su origen monoclonal o policlonal. Como se esperaba, se comprobó que los tres tumores humanos examinados por este método tenían un origen monoclonal.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., y Feinberg, A. B. Use of restriction fragment length polymorphism to determine the clonal origin of tumors. *Science* 227:642, 1985.



Análisis del DNA genómico para determinar el origen clonal de los tumores.
(*a*) El gen de la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (*HGPRTasa*) ligada al cromosoma X contiene dos sitios BamHI invariantes (B1 y B3), mientras que en algunos individuos un tercer sitio, B2, también está presente. El gen de la *HGPRTasa* también contiene varios sitios HhaI; sin embargo, todos estos sitios, excepto H1, están normalmente metilados en el cromosoma X activo. Por lo tanto, sólo el sitio H1 sería susceptible de ser cortado por Hha1 en el cromosoma X activo. Para determinar qué forma del gen *HGPRTasa* está presente en un tumor y para saber si se encuentra en un cromosoma X activo, se emplea una sonda marcada y clonada, la pPB1,7. (*b*) Los patrones de restricción previstos para tumores monoclonales y policlonales son los siguientes: (1) Cortado sólo con BamH1, fragmento de 24-kb derivado del gen de la *HGPRTasa* conteniendo sólo sitios B1 y B3 y fragmento de 12-kb derivado de un gen de la *HGPRTasa* conteniendo un sitio B2 extra. El patrón es característico de un individuo heterocigoto. (2) Cortado con BamHI y HhaI. Tumor monoclonal con las 12 kb derivadas de un cromosoma X activo (metilado). (3) Cortado con BamHI y HhaI; tumor monoclonal con el fragmento de 24 kb derivado de un cromosoma X activo (metilado). (4) Cortado con BamHI y HhaI. Tumor policlonal. Todos los tumores estudiados muestran los patrones mostrados en el carril 2 o en el carril 3.



APLICACIÓN CLÍNICA 7.6

Aplicación de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla para la detección de mutaciones espontáneas que pueden causar el SIDS

El síndrome de la muerte súbita infantil (SIDS) es una de las causas de muerte más importantes durante el primer año de vida en Estados Unidos. Un estudio exploratorio de más de 34 000 recién nacidos por electrocardiografía mostró una correlación significativa entre el riesgo de SIDS y un intervalo QT prolongado en el ECG. Como resultado de este estudio, se decidió buscar una mutación en alguno de los genes relacionados con el síndrome del QT largo en un niño de 44 días que presentaba cianosis, apnea y falta de pulso. La arritmia con un intervalo QT prolongado fue estabilizada por desfibrilación repetida, seguida de tratamiento farmacológico. Se preparó DNA genómico a partir de la sangre periférica del niño y de sus padres. Mediante el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla del DNA del niño, pero no de los padres, se encontró que un gen asociado con el síndrome del QT largo contenía una sustitución de AAC por TCC en las posiciones 2971 y 2972 (proteína asociada con el canal de sodio). La mutación resulta en la sustitución de un residuo de serina por uno de asparagina en una región muy conservada de la proteína, que presumiblemente participa en la función del canal de sodio. La mutación no fue detectada en 200 sujetos control. La conclusión de este caso fue que el niño presentaba una mutación espontánea en un gen asociado con un intervalo QT largo, y que éste contribuía al SIDS. Después del tratamiento y del seguimiento el niño seguía libre de síntomas a los cinco años de edad. Este estudio muestra el valor potencial del examen electrocardiográfico neonatal para reducir la mortalidad por SIDS.

Schwartz, P. J., Priori, S. G., Dumaine, R., Napolitano, C., Antzelevitch, C., Stramba-Badiale, M., Richard, T. A., Berji, M. R., y Bloise, R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 343:262, 2000.

se Apli. Clín. 7.6). Este método requiere el conocimiento previo de la secuencia del gen o de un fragmento del mismo, mientras que el análisis por RFLP requiere tan solo confeccionar el mapa de restricción del DNA.

Métodos para detectar mRNA

El análisis de la presencia, ausencia o cantidad de una especie de mRNA en los tejidos o en preparaciones de RNA total es, en general, fundamental para la comprensión de la regulación génica del crecimiento celular y la diferenciación tisular. Es posible determinar el momento, el nivel y el sitio de expresión génica dentro de un tejido a través del análisis de especies de mRNA específicas. Se dispone de diversas técnicas para detectar la presencia y/o la cantidad de una especie de mRNA específico en una preparación de RNA total: (1) La **transferencia Northern** requiere la separación electroforética de las especies de RNA por tamaño en gel de agarosa, seguida de transferencia y entrecruzamiento a una membrana, de forma similar a la transferencia Southern. Las especies de RNA fijadas son a continuación hibridadas con una sonda específica del RNA buscado. Si la sonda está marcada con radiactividad, los híbridos se pueden detectar por autorradiografía. También se dispone de métodos no radiactivos. La transferencia Northern permite la rápida determinación del tamaño del mRNA y la identificación de transcritos procedentes de corte y empalme alternativo y/o la presencia de transcritos de familias multigénicas. (2) La **RT-PCR** (véase la Sección 7.8) permite, a diferencia de la transferencia Northern, cuantificar la cantidad de mRNA, tanto si es poco (teóricamente una sola copia es suficiente) o muy abundante. La cuantificación se basa en la comparación de la cantidad relativa de un producto de PCR de un transcrito que hace las veces de control interno con el nivel detectado para un mRNA específico presente en la misma muestra. Entre los transcritos usados como control interno se encuentran la GAPDH (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) y la β-actina. (3) El ensayo de **protección frente a nucleasa** (NPA) no da información del tamaño del mRNA, sin embargo, es idóneo para el análisis simultáneo de múltiples especies de mRNA presentes en una muestra de RNA. La sonda(s) marcadas o no marcadas se hibridan con la muestra de RNA en disolución. La hibridación en disolución es más eficiente que la hibridación del RNA fijado sobre la membrana, usada en la transferencia Northern. La sonda no hibridada y el RNA de cadena sencilla son hidrolizados con nucleasas después de la hibridación. La mezcla de especies hibridadas se separa en un gel de bajo porcentaje (6%) de acrilamida. El tamaño de las especies hibridadas está determinado por el tamaño de la sonda empleada. El NPA se usa habitualmente para detectar la presencia o ausencia de

transcritos de mRNA en diferentes tejidos (Figura 7.14). (4) La **hibridación *in situ*** es la única técnica de las cuatro descritas en esta sección para determinar qué células de una muestra de tejido fijado con formol expresa un gen determinado. En este método el RNA no es aislado ni sometido a separación electroforética. El tejido se fija, se secciona y se monta en portas de microscopia. Las proteínas son digeridas con proteinasa K para aumentar la accesibilidad de la sonda marcada hasta el mRNA celular buscado. Este método complementa los resultados de los ensayos de protección frente a nucleasa y también permite definir qué tipos celulares en los tejidos expresan el mRNA buscado.

Análisis de proteínas de unión específica al DNA

Está establecido que las proteínas reguladoras se unen a secuencias de DNA específicas en los flancos de los genes y que estimulan o inhiben la expresión génica. El **ensayo del corrimiento de la movilidad electroforética** (EMSA) o método de los geles de retardo se ha utilizado ampliamente para analizar la unión de proteínas de unión específica al DNA junto con las secuencias de DNA necesarias para la unión. Las proteínas potencialmente capaces de unirse al DNA pueden obtenerse a partir de extractos celulares totales, extractos nucleares, preparaciones de proteínas purificadas o proteínas recombinantes obtenidas de sistemas de expresión. La sonda de DNA está marcada con radiactividad. Consiste en fragmentos de DNA, oligonucleótidos sintéticos de doble cadena o DNA clonado que contenga un sitio de unión potencial o conocido para una proteína. El DNA debe ser de doble cadena, pues el DNA de cadena sencilla se uniría a proteínas de unión a cadena sencilla no específicas (en el caso de extractos celulares o nucleares) que interferirían con la interpretación de los resultados. La sonda purificada de DNA marcado y la muestra de proteína se incuban antes del análisis electroforético para garantizar la formación de un complejo proteína-DNA estable.

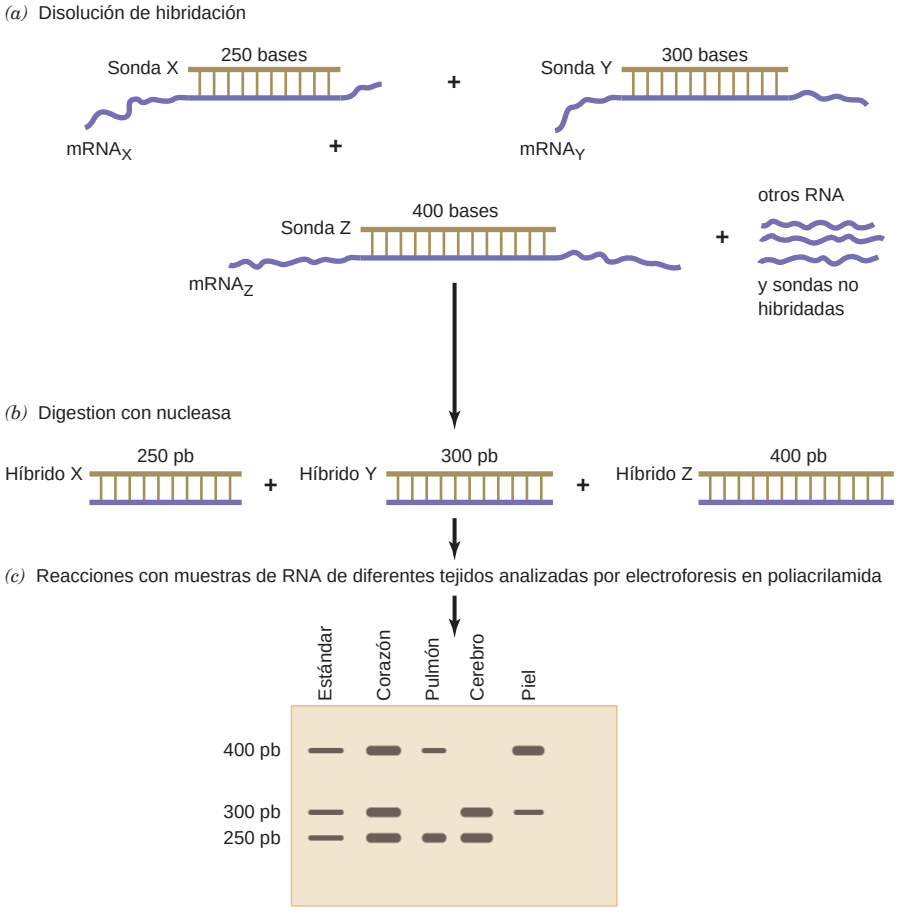


FIGURA 7.14
Ensayo de protección frente a nucleasas. El mRNA celular total puede ser aislado a partir de distintos tejidos. Sondas de DNA de cadena sencilla, complementarias de secuencias conocidas de diferentes transcritos génicos ($mRNA_x$, $mRNA_y$, $mRNA_z$), se hibridan con la mezcla de RNA. La digestión con una ribonucleasa hidrolizará las regiones de RNA de cadena sencilla que no hayan hibridado con la sonda de DNA, y también todas las especies de RNA que no hayan hibridado. Sólo los híbridos DNA-RNA estarán protegidos frente a la nucleasa y podrán ser analizados por electroforesis. De esta forma, la expresión diferencial de genes en tejidos específicos es fácilmente observable.

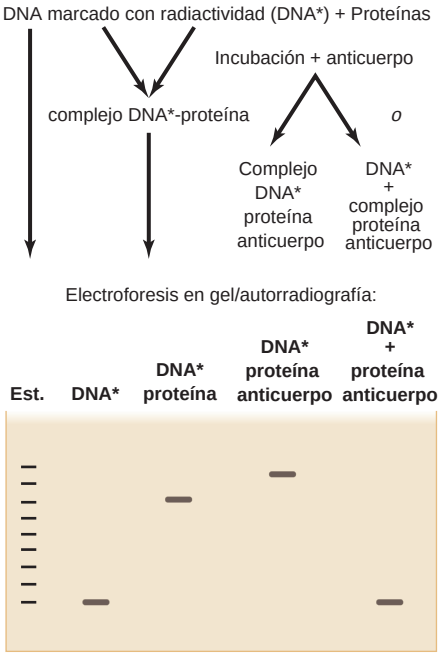


FIGURA 7.15
Geles de retardo.
El DNA purificado migra a través de un gel bajo el influjo de un campo eléctrico en función de su carga y de su masa molecular. Si se añade una proteína(s) que se una al DNA, la masa molecular aparente total del DNA aumenta. Ello disminuye la migración del DNA a través del gel —se produce un retardo. Si se añade un anticuerpo que reaccione con la proteína unida al DNA sin interferir con la interacción proteína-DNA, la migración disminuirá todavía más. Si el anticuerpo reacciona con la región de unión al DNA de la proteína no se formará el complejo DNA-proteína. En ambos casos el anticuerpo ayuda a identificar la proteína de unión al DNA.

La Figura 7.15 representa esquemáticamente los resultados esperados cuando los complejos de DNA con una proteína marcados radiactivamente se traducen en un retardo de los complejos en relación con el DNA libre. Si se añade a la mezcla un anticuerpo de la proteína de unión al DNA, hay dos posibilidades. Si el anticuerpo se une a un epitopo que no impide la unión de la proteína al DNA, aumenta el tamaño del complejo y se produce un **super corrimiento** (un retardo mayor) en la migración en el gel (Figura 7.15). Por el contrario, si el anticuerpo bloquea el sitio de unión de la proteína al DNA, se formará un complejo proteína-anticuerpo y la sonda de DNA marcada no verá modificada su migración a través del gel. En ambos casos, el resultado con el anticuerpo confirma la identidad de la proteína de unión al DNA.

7.8 | DNA COMPLEMENTARIO Y GENOTECAS DE DNA COMPLEMENTARIO

La inserción de genes eucarióticos funcionales específicos en vectores que pueden expresarse en una célula procariótica puede producir grandes cantidades de proteínas "diseñadas genéticamente" con un gran potencial en medicina, agricultura e investigación. Mediante estas técnicas se producen actualmente algunos enzimas y hormonas, tales como la insulina, la eritropoyetina, la trombopoyetina, las interleuquinas, el interferón y el activador tisular del plasminógeno. Desgraciadamente, es imposible, excepto en raras ocasiones, clonar genes funcionales a partir de DNA genómico. Una de las causas es que la mayoría de los genes que forman parte del genoma de los mamíferos producen transcritos que contienen intrones que han de eliminarse del transcrito primario de mRNA. Los sistemas procarióticos no pueden cortar los intrones para dar transcritos de mRNA funcionales. Este problema puede soslayarse sintetizando **DNA complementario (cDNA)** a partir de mRNA eucariótico funcional.

Para la síntesis de DNA con transcriptasa inversa se utiliza RNA mensajero como molde

El RNA mensajero puede retrotranscribirse a cDNA y éste insertarse en un vector para su amplificación, identificación y expresión. Las células de mamífero contienen normalmente entre 10 000 y 30 000 especies diferentes de mRNA en cualquier momento del ciclo celular. Sin embargo, en algunos casos, un mRNA específico puede representar el 90% del mRNA total, tal como sucede con el mRNA de la globina en los reticulocitos. Muchos mRNA están presentes normalmente en sólo unas pocas copias (1–14) por célula. A partir del mRNA celular total puede construirse una **genoteca de cDNA**, pero si un mRNA presenta solamente unas pocas copias por célula, su cDNA puede resultar muy difícil de identificar. Se han desarrollado métodos para enriquecer la población de mRNA o sus correspondientes cDNA. Ello permite reducir el tamaño o el número de especies de cDNA diferentes que han de rastrearse en una genoteca de cDNA y aumenta enormemente la probabilidad de identificar el clon buscado.

Una muestra puede enriquecerse en un determinado mRNA mediante técnicas de separación

El RNA mensajero puede separarse por tamaño por electroforesis en gel o por centrifugación. La utilización de mRNA de un intervalo de tamaño molecular específico enriquece varias veces un determinado mRNA. El conocimiento de la masa molecular de la proteína codificada por el gen estudiado da una idea del tamaño aproximado del transcrito de mRNA o de su cDNA; sin embargo, las diferencias en la longitud de las regiones no traducidas de los mRNA causan variaciones en el tamaño predicho.

El enriquecimiento de un mRNA específico también puede conseguirse por procedimientos inmunológicos, pero se necesita disponer de anticuerpos contra la proteína codificada por el gen estudiado. Los anticuerpos añadidos a una mezcla de

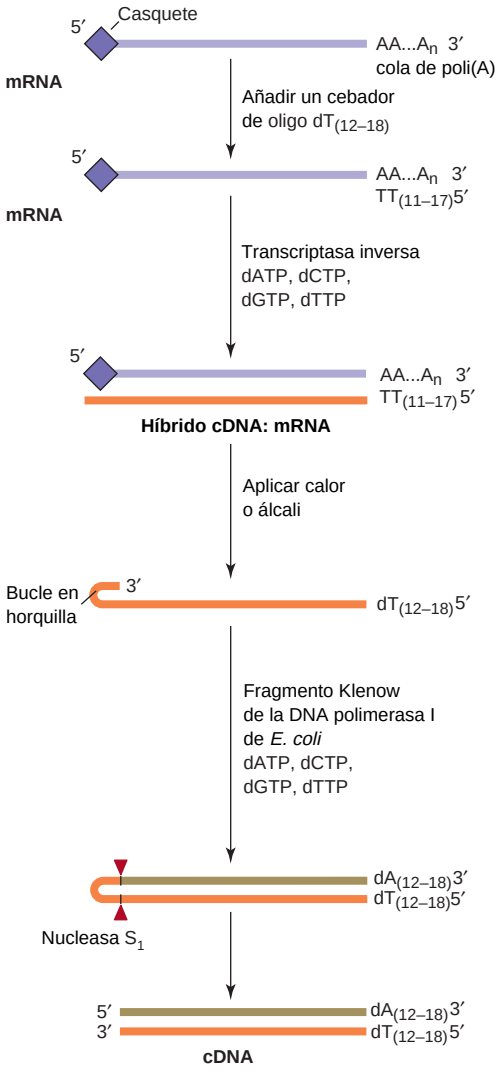


FIGURA 7.16
Síntesis de cDNA a partir de mRNA.
La cola de poli(A) del extremo 3′ del mRNA se hibrida con un oligómero de dT [oligo(dT)12–18] que actúa como cebador para la transcriptasa inversa que cataliza la síntesis de la cadena de DNA complementaria (cDNA) en presencia de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (dNTP). El híbrido de cDNA–mRNA resultante libera el cDNA de cadena simple mediante desnaturalización por calor o bien hidrolizando el mRNA con álcali. El extremo 3′ de la molécula de cDNA forma un lazo en horquilla que actúa como cebador en la síntesis de la segunda cadena de DNA catalizada por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*. El lazo de DNA de cadena simple desapareado se hidroliza con nucleasa S_1, obteniéndose una molécula de DNA de cadena doble.

síntesis proteica *in vitro* reaccionan con la cadena polipeptídica en crecimiento asociada con el polisoma, provocando su precipitación. El mRNA puede purificarse a partir de la fracción polisómica inmunoprecipitada.

Síntesis de DNA complementario

Una mezcla de mRNA se utiliza como molde para sintetizar una cadena de DNA complementaria mediante una DNA polimerasa dependiente de RNA, la **transcriptasa inversa** (Figura 7.16). Para la reacción se necesita un cebador; se aprovecha la presencia de la cola de poli(A) en el lado 3′ del mRNA eucariótico. Como cebador se utiliza un oligo(dT) de 12-18 bases que hibrida con la secuencia de poli(A). Tras la síntesis del cDNA, se desnaturaliza el híbrido o se hidroliza el mRNA con álcali para obtener el cDNA de cadena sencilla. El extremo 3′ de los cDNA de cadena sencilla forma una horquilla que sirve como cebador para la síntesis de la segunda cadena de cDNA. Para este paso pueden utilizarse tanto el fragmento Klenow como la transcriptasa inversa. El cDNA de doble cadena resultante contiene un lazo de cadena sencilla que es selectivamente reconocido y digerido por la nucleasa S1. Los extremos del cDNA han de modificarse antes de su clonación en un vector. Uno de los métodos consiste en incubar moléculas de cDNA de extremos romos con moléculas adaptadoras y un enzima, la DNA ligasa del bacteriófago T4, que cataliza la

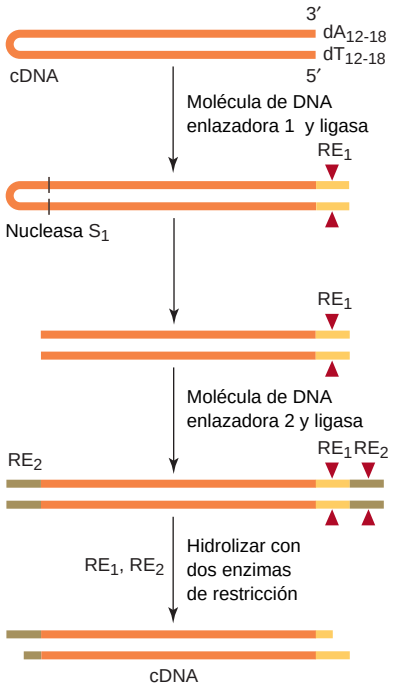


FIGURA 7.17
Modificación del cDNA para clonación.
El procedimiento comienza con DNA de cadena doble que contiene un lazo en horquilla. Por ligación de extremos romos, se añade un DNA adaptador al extremo libre del cDNA que contiene un sitio de endonucleasa de restricción (RE_1). A continuación, el lazo en horquilla de cadena sencilla se hidroliza con nucleasa S_1. Un segundo adaptador con un sitio diferente de endonucleasa de restricción (RE_2) se liga por extremos romos al cDNA libre recién obtenido. El segundo adaptador se une probablemente a ambos extremos, pero no interfiere con el primer sitio de endonucleasa de restricción. El DNA modificado se hidroliza con las dos endonucleasas de restricción, pudiéndose insertar en un plásmido o DNA de bacteriófago mediante clonación direccional.

unión de moléculas de extremos romos (Figura 7.17). Los adaptadoras sintéticos contienen sitios para endonucleasas de restricción que pueden hidrolizarse con el enzima apropiado para la inserción del cDNA en un vector cortado con la misma endonucleasa.

El DNA de bacteriófago (véase p. 305) es el vector más conveniente y eficiente para crear genotecas de cDNA, ya que éstas pueden amplificarse rápidamente y conservarse indefinidamente. Para producir genotecas de cDNA se ha utilizado dos bacteriófagos, **λgt10** y **λgt11**, y sus derivados más recientes. Las genotecas de cDNA en λgt10 sólo pueden rastrearse con sondas de ácido nucleico marcadas, mientras que las de λgt11, un vector de expresión, también pueden ser rastreadas con anticuerpos para detectar la producción de la proteína o antígeno. Si se conoce la secuencia del cDNA deseado, puede usarse la PCR para rastrear el bacteriófago recombinante.

El RNA celular total puede hacer de molde para la síntesis de DNA usando la RT-PCR

Existen métodos alternativos para construir genotecas de cDNA que emplean la **técnica de la transcriptasa inversa–PCR (RT-PCR)** y eliminan la necesidad de purificar el mRNA. Uno de estos métodos se ilustra en la Figura 7.18. Empieza con la síntesis mediante la transcriptasa inversa de un híbrido DNA–mRNA. Luego se añade una cola homopolimérica de dG al extremo 3′ mediante la terminal transferasa y se procede a hidrolizar el mRNA. A continuación, se añaden cebadores para la PCR, sintetizados para que hibriden con las colas de dG y dA y que posean en sus extremos las secuencias de dos endonucleasas de restricción diferentes. El cDNA amplificado resultante puede entonces hidrolizarse con dos endonucleasas de restricción diferentes y ser clonado direccionalmente en un vector adecuado (véase la p. 287).

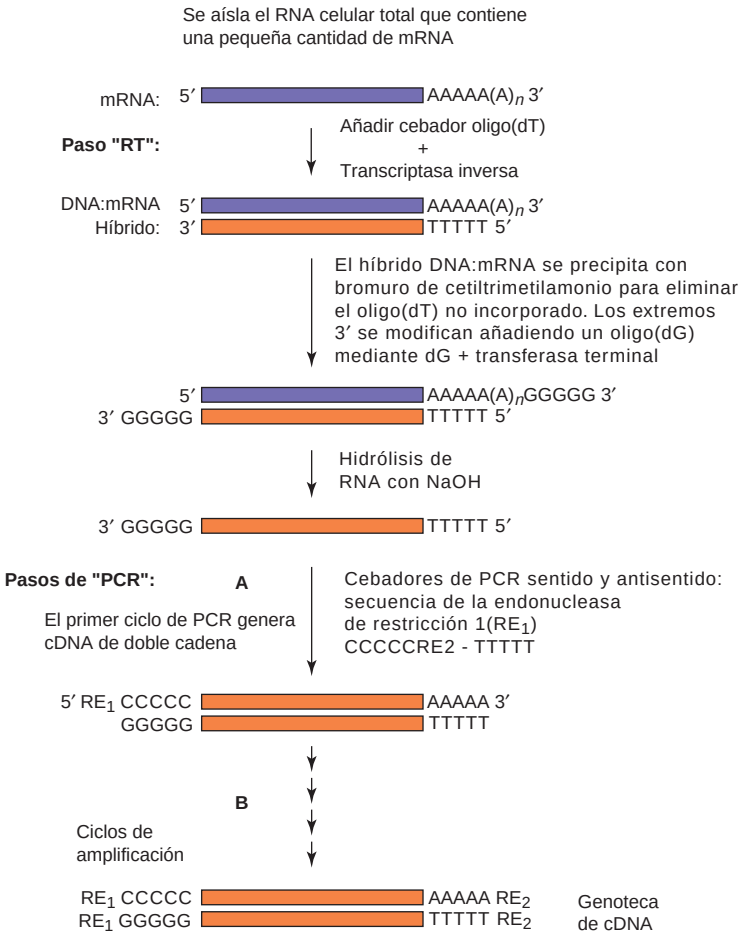


FIGURA 7.18
Obtención de cDNA mediante transcriptasa inversa y PCR (RT-PCR).
Para obtener cDNA mediante RT-PCR puede utilizarse tanto RNA celular total como mRNA. El mRNA con una cola de oligo (rA) es transcrito inversamente empleando como cebador un oligo dT. Se añade una cola compuesta por un oligo (dG) a los extremos 3′ de las hebras de RNA y de DNA y la cadena de RNA se hidroliza posteriormente con NaOH. Para amplificar el cDNA mediante PCR se emplean cebadores con sentido y antisentido. Los productos resultantes se hidrolizan con nucleasas de restricción específicas (RE_1 y RE_2) para la clonación y estudios posteriores.

7.9 VECTORES DE CLONACIÓN EN BACTERIÓFAGOS, CÓSMIDOS Y LEVADURAS

La presencia de secuencias no codificadoras en la mayoría de los genes eucarióticos, así como la de regiones reguladoras distantes en los flancos de los genes, hizo necesarias nuevas estrategias de clonación para empaquetar fragmentos de DNA mayores que los que pueden clonarse en **plásmidos**. Los plásmidos pueden incorporar insertos de DNA foráneo de una longitud máxima del orden de 5–10 kb (kilobases). Fragmentos de DNA recombinante mayores que éstos son delecionados al azar durante la replicación del plásmido dentro de la bacteria. Por consiguiente, se han desarrollado vectores alternativos.

Los bacteriófagos como vectores de clonación

El **bacteriófago λ (fago λ)**, un virus que infecta y se replica en bacterias, es un vector ideal para insertos de DNA de aproximadamente 15 kb de longitud. El fago λ infecta bacterias selectivamente y se puede replicar tanto por una ruta lítica como por una no lítica (lisogénica). El fago λ contiene una cola autocomplementaria de cadena sencilla de 12 bases (extremos cohesivos) en ambos extremos de su molécula de DNA de doble cadena de 50 kb. Tras la infección de la bacteria, los extremos cohesivos (sitios cos) de una misma molécula de DNA de fago λ se asocian por complementariedad y la DNA ligasa de la célula huésped los une covalentemente. La molécula de DNA circular sirve de molde para la transcripción y la replicación. Para infectar bacterias se utilizan fagos λ que llevan insertados fragmentos, obtenidos con endonucleasas de restricción, que representan la totalidad del DNA genómico de una célula. Los bacteriófagos recombinantes, liberados por las células lisadas, se recogen y constituyen una genoteca genómica en el bacteriófago λ. Una genoteca de fagos puede rastrearse más rápidamente que una genoteca de plásmidos, debido al mayor tamaño de los insertos de DNA.

Se han construido numerosos vectores derivados del bacteriófago λ para diferentes estrategias de clonación. En aras de la simplicidad, aquí solamente se describirá un vector genérico del fago λ. La clonación de fragmentos grandes de DNA en el bacteriófago λ se basa en el hecho de que un segmento de 15–25 kb del DNA del fago puede sustituirse sin perjudicar su replicación en *E. coli* (Figura 7.19). El empaquetamiento del DNA del fago en partículas víricas está limitado por la longitud total del DNA, que ha de ser de aproximadamente 50 kb. El DNA lineal de fago λ puede digerirse con endonucleasas de restricción específicas, que generen pequeños fragmentos terminales con sus **sitios cos** (brazos), que se separan de los fragmentos intermedios mayores. El DNA genómico celular se digiere parcialmente con los enzimas de restricción apropiados para permitir la asociación por complementariedad y la ligación con los brazos del fago, con el fin de generar fragmentos al azar que puedan empaquetarse adecuadamente en partículas de fago. Los fragmentos de DNA mayores y menores de 15–25 kb pueden hibridar con los brazos cos, pero no son empaquetados en partículas de bacteriófago infectivas. Toda la información necesaria para la infección y la replicación del fago en las bacterias está incluida en los brazos cos. El DNA del fago recombinante se mezcla *in vitro* con proteínas de fago λ que forman los viriones infectivos. A continuación, los bacteriófagos λ recombinantes infectivos se propagan en una cepa de *E. coli* apropiada para obtener una genoteca de fago λ. Se han modificado genéticamente muchas cepas de *E. coli* diferentes para sostener la replicación de viriones recombinantes específicos.

Rastreo de genotecas de bacteriófagos

La **genoteca de bacteriófagos** puede rastrearse sembrando los virus sobre una capa continua de bacterias (un césped bacteriano) en una placa de agar (Figura 7.20). Cada fago infectará una célula, se replicará y la lisará. A continuación, la descendencia de viriones infectará y, en consecuenia, lisará las bacterias adyacentes al lugar de la primera célula infectada, creando entonces una región clara o calva en el

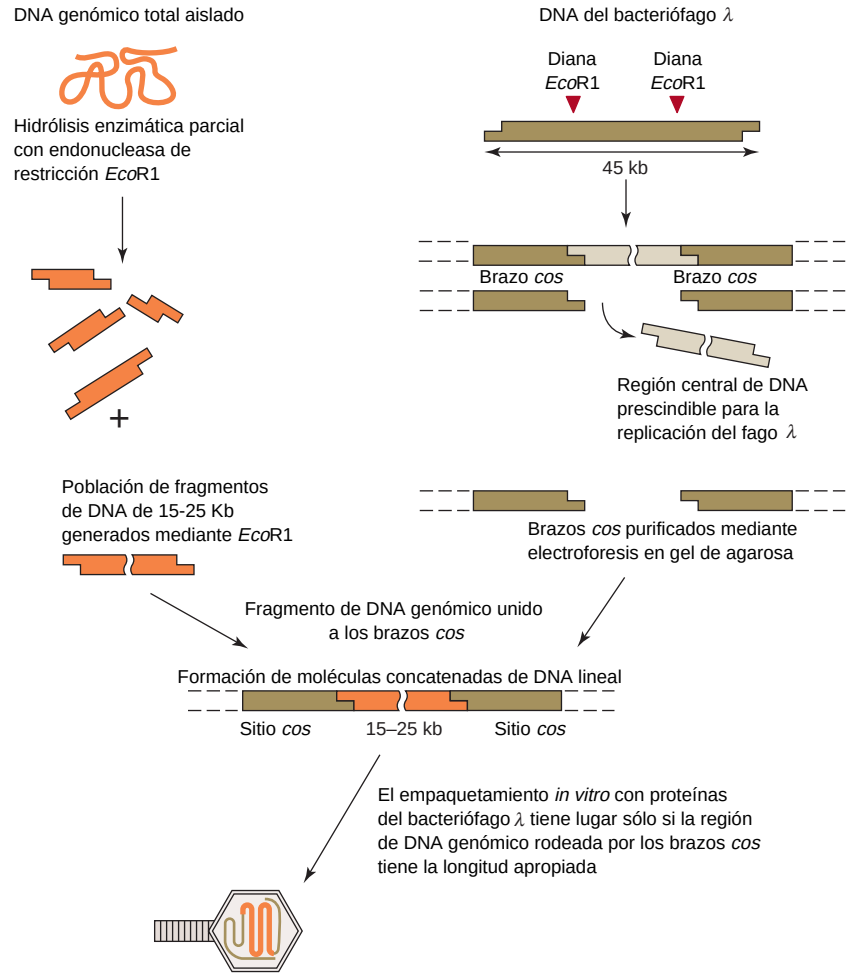


FIGURA 7.19
Clonación de DNA genómico en el bacteriófago λ.
El DNA genómico total se digiere parcialmente con una endonucleasa de restricción (p. ej., EcoRI). El resultado son fragmentos al azar de DNA de diferente tamaño con extremos cohesivos de cadena sencilla. Los fragmentos de DNA, brazos cos, se obtienen con la misma endonucleasa de restricción a partir de DNA de bacteriófago. Los fragmentos de brazos cos purificados llevan las señales de secuencia necesarias para introducir el DNA en un virión. Los fragmentos genómicos se mezclan con los brazos cos, se asocian por complementación y se ligan, formando moléculas de DNA concatenadas lineales. El empaquetamiento *in vitro* con proteínas de bacteriófago **λ** se produce sólo con fragmentos de DNA genómicos de longitud permitida (15–25 kb) delimitados por brazos cos.

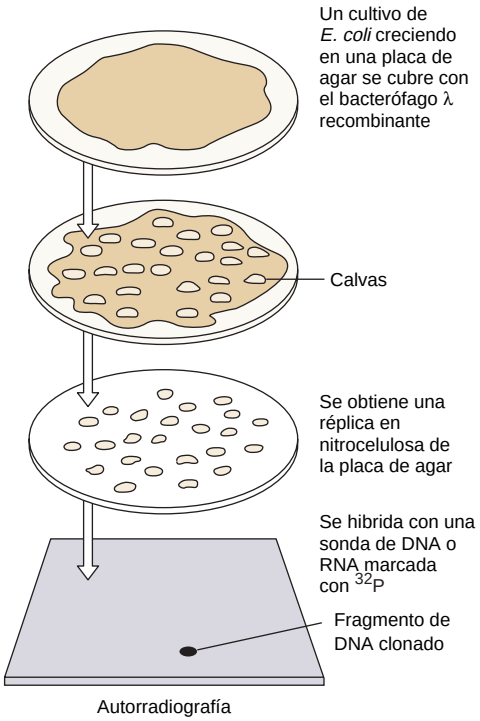


FIGURA 7.20
Rastreo de genotecas genómicas en bacteriófago λ.
Se cultivan *E. coli* competentes sobre una placa de agar hasta la confluencia; a continuación se cubren con el bacteriófago recombinante. Se forman calvas allí donde las bacterias han sido infectadas, y posteriormente lisadas por el fago **λ**. Pueden hacerse réplicas poniendo la placa en contacto con un filtro de nitrocelulosa. El DNA se fija a la nitrocelulosa y se desnaturaliza con NaOH. El DNA unido se hibrida con una sonda marcada con ^{32}P y se expone a película de rayos X. La autorradiografía identifica la calva o calvas con el DNA recombinante buscado.

campo bacteriano opaco. Los fagos contenidos en cada calva pueden recogerse sobre un filtro de nitrocelulosa (como para la réplica en placa), fijándose el DNA al filtro con NaOH. La localización de fragmentos de DNA de interés clonado se realiza por hibridación del filtro con una sonda de DNA o RNA marcada, e identificando su posición por autorradiografía. Los bacteriófagos correspondientes al híbrido marcado unido al filtro se recogen de la placa y se amplifican para su análisis posterior. También puede usarse la PCR si se conoce la secuencia total o parcial del cDNA buscado. Se toman porciones de varias placas, y si el DNA buscado está presente en una o más, una región puede amplificarse por PCR con una pareja apropiada de cebadores. El producto de la PCR se detecta por electroforesis. También se construyen genotecas de DNA complementario que contienen los brazos cos del fago. Si el cDNA se recombina con DNA de fago que permita la expresión del gen,

tal como λgt11, entonces las calvas pueden rastrearse inmunológicamente con anticuerpos específicos contra el antígeno.

Clonación de fragmentos de DNA en cósmidos y cromosomas artificiales de levadura

Aunque el bacteriófago λ es el vector más utilizado para construir genotecas de DNA genómico, la longitud de muchos genes supera el tamaño máximo del DNA que puede insertarse entre los brazos del fago. Un **vector cósmido** puede incorporar insertos de DNA foráneo de aproximadamente 45 kb. Los **cromosomas bacterianos artificiales (BAC)** y los **cromosomas de levadura artificiales (YAC)** se han desarrollado para clonar fragmentos de DNA de 100-200 kb y 200–500 kb, respectivamente. Si bien los vectores de tipo cósmido y los cromosomas de levadura artificiales son difíciles de manejar, sus genotecas permiten la clonación de genes grandes junto con sus secuencias reguladoras flanqueantes, así como familias génicas o genes contiguos.

Los cósmidos son un híbrido de los vectores plasmídicos y de los bacteriófagos. Los cósmidos contienen un gen de resistencia a antibiótico para la selección de las moléculas de DNA recombinante, un origen de replicación para su propagación en bacterias y un sitio cos para el empaquetamiento de las moléculas recombinantes en partículas de bacteriófago. Los bacteriófagos con DNA de cósmidos recombinantes pueden infectar *E. coli* e inyectar su DNA en la célula. Los vectores de tipo cósmido contienen sólo unas 5 kb de las 50 kb del DNA del bacteriófago y, por lo tanto, no pueden dirigir ni su replicación ni la formación de nuevas partículas de fago infectivas. En cambio, el DNA del cósmido recombinante se circulariza y se replica como un plásmido de gran tamaño. Las colonias bacterianas con recombinantes de interés pueden seleccionarse y amplificarse por métodos similares a los descritos para los plásmidos.

Para construir los YAC se utilizan procedimientos de clonación estándar junto con algunos métodos nuevos. Fragmentos de DNA foráneo muy grandes se unen a dos secuencias de DNA de levadura, una que funciona como telómero (extremidad distal de un brazo de cromosoma) y otra que funciona a la vez como centrómero y como origen de replicación. El DNA recombinante del YAC se introduce en la levadura por transformación. Los YAC se han diseñado de tal modo que las levaduras transformadas con cromosomas recombinantes crecen formando colonias que se distinguen visualmente, lo que facilita la selección y el análisis de los fragmentos de DNA clonado.

7.10 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE FRAGMENTOS LARGOS DE DNA

La subclonación permite caracterizar grandes segmentos de DNA

El análisis completo de los elementos funcionales en un fragmento de DNA clonado requiere la secuenciación de la molécula entera. Las técnicas actuales permiten secuenciar fragmentos de 200–400 bases, sin embargo, los insertos de DNA clonados son frecuentemente mucho mayores. Los mapas de restricción del clon de DNA inicial son esenciales para cortar el DNA en fragmentos más pequeños, para ser reclonados o **subclonados** para su análisis posterior. A continuación, puede determinarse la secuencia de cada uno de los pequeños fragmentos de DNA subclonados. Las regiones de DNA subclonado que se solapan se alinean correctamente, confirmando así la secuencia del clon original.

Normalmente es posible secuenciar sin tener que recurrir a la subclonación. Se pueden sintetizar cebadores antisentido que sean complementarios a la secuencia 3′ obtenida con anterioridad a partir de un DNA clonado. Este proceso se repite hasta que se obtiene la secuencia completa del DNA clonado. Este método elimina la necesidad de preparar subclones, aunque requiere la síntesis/compra de numerosos cebadores. Cada subclón se inserta siempre en la misma posición del plásmido, por lo tanto, es suficiente un único juego de cebadores que flanqueen el DNA a secuenciar en todas las reacciones de secuenciación de los diferentes subclones.

El paseo cromosómico es una técnica para definir la disposición de genes en fragmentos de DNA largos

El conocimiento de la disposición de los genes y de sus elementos reguladores en un cromosoma debería ayudar a la comprensión de cómo conjuntos de genes se regulan de forma coordinada. Es difícil clonar fragmentos de DNA lo suficientemente grandes para identificar en ellos genes contiguos. La combinación de varias técnicas permite el análisis de fragmentos de DNA muy largos (50–100 kb). El método del **paseo cromosómico** es posible gracias a que las genotecas de cósmidos o de bacteriófagos **λ** contienen DNA genómico parcialmente cortado en sitios de endonucleasas de restricción específicos. Los fragmentos clonados contienen secuencias que se solapan con otros fragmentos clonados. Las regiones de solapamiento pueden identificarse mediante la obtención de mapas de restricción, subclonación, rastreo de genotecas de cósmidos o de bacteriófago **λ** y secuenciación.

El procedimiento del método del "paseo cromosómico" se muestra en la Figura 7.21. Inicialmente se rastrea la genoteca de fagos **λ** con una sonda de DNA o

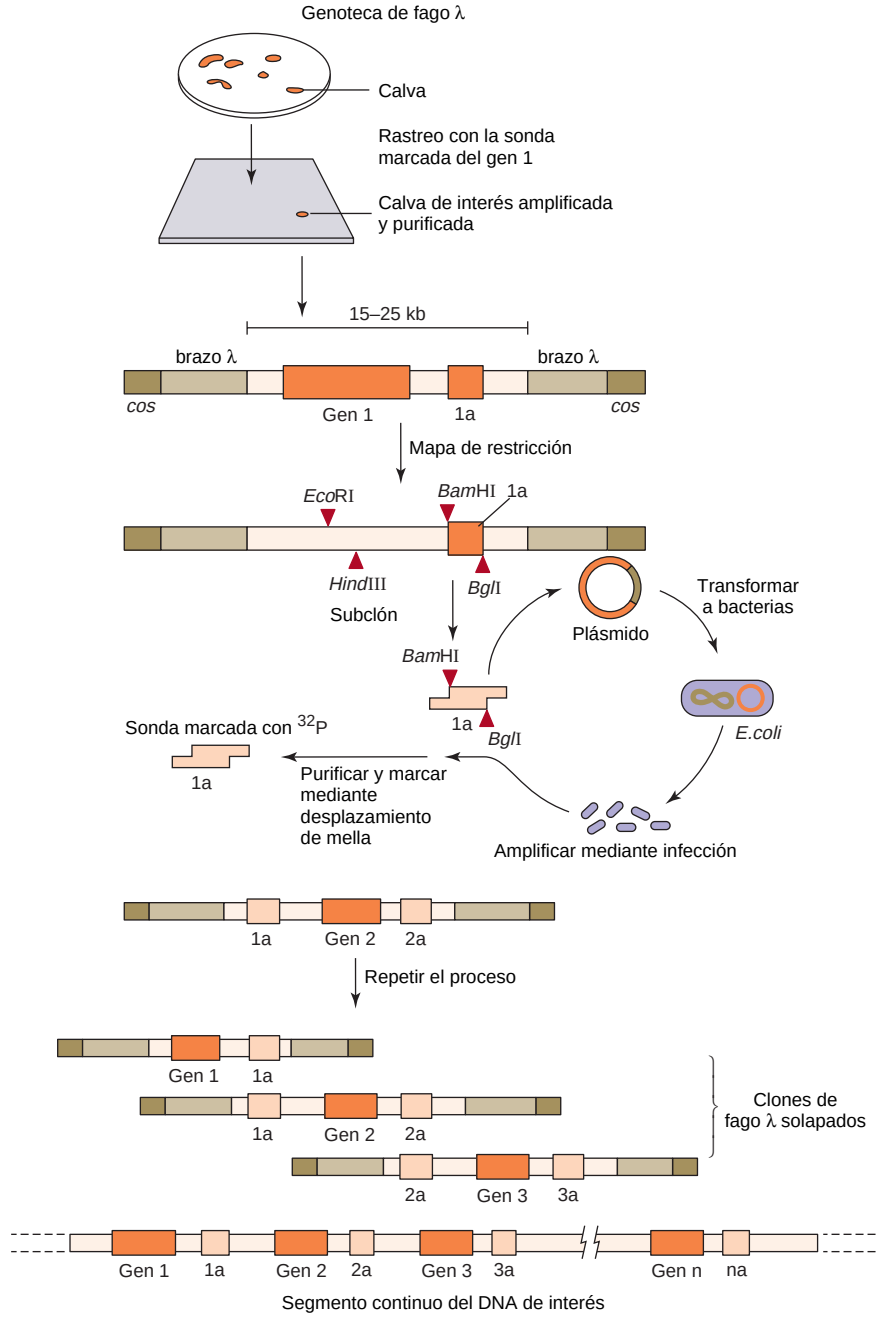


FIGURA 7.21
Paseo cromosómico para analizar segmentos de DNA contiguos en un genoma.
Para rastrear una genoteca en busca de un fago **λ** recombinante que contenga un gen de interés, se marca un fragmento de DNA por desplazamiento de la mella. Con una batería de endonucleasas de restricción se obtiene el mapa de restricción para seleccionar una nueva región (1a) dentro del DNA clonado originalmente, que pueda volver a clonarse (subclonarse). El DNA subclonado (1a) se utiliza para identificar otros fragmentos de DNA en la genoteca original que se solapen con la región de DNA inicialmente amplificada. El proceso puede repetirse muchas veces para identificar regiones de DNA contiguas más arriba o más abajo del DNA inicial (gen 1) de interés.

RNA en busca de una secuencia de interés. Se obtiene el mapa de restricción del DNA clonado y se subclona un pequeño segmento en un plásmido, se amplifica, se purifica y se marca por el método del desplazamiento de la mella. Esta sonda marcada se utiliza después para volver a rastrear la genoteca de fagos **λ** en busca de secuencias complementarias, que son clonadas a continuación. El DNA clonado recién identificado se trata del mismo modo que el clon de DNA inicial para buscar otras secuencias que se solapen. En los genomas de los eucariotas superiores se han de tomar precauciones para que el DNA subclonado no contenga una secuencia común a un gran número de secuencias de DNA repetitivo. Si una sonda de DNA subclonada contiene una secuencia repetida, hibridará con un gran número de calvas de bacteriófago, impidiendo así la identificación de un clon con solapamiento específico.

7.11 VECTORES DE EXPRESIÓN Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN

La metodología del DNA recombinante descrita hasta este punto ha tratado principalmente del rastreo, amplificación y purificación de especies de DNA clonadas. Como ya se mencionó anteriormente, un objetivo importante de los estudios de DNA recombinante consiste en expresar un gen foráneo en bacterias y obtener el producto génico en una forma biológicamente activa. La secuenciación del DNA de muchos genes bacterianos y de sus regiones adyacentes ha permitido identificar la disposición espacial de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de los genes. Para transcribir un gen se necesita un promotor y otros elementos reguladores situados más arriba del gen (véase la p. 332). Sin embargo, un transcrito de mRNA de un gen eucariótico recombinante no se traduce en un sistema bacteriano, ya que le falta la secuencia de reconocimiento bacteriana, secuencia de Shine–Dalgarno, necesaria para orientarlo correctamente con un ribosoma bacteriano funcional. Se han construido vectores, denominados **vectores de expresión**, que facilitan la transcripción funcional de insertos de DNA, lo que permite que un gen foráneo pueda insertarse en el vector más abajo de un promotor regulado, pero dentro de un gen bacteriano, usualmente el gen *lacZ*. El transcrito de mRNA del DNA recombinante contiene la secuencia Shine–Dalgarno del *lacZ*, los codones para una porción del extremo 3′ de la proteína codificada por el gen *lacZ*, seguidos por los codones del gen foráneo completo. El producto proteico es una **proteína de fusión** que contiene unos pocos aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína del gen *lacZ* y la secuencia de aminoácidos completa del producto génico foráneo.

Los genes foráneos expresados en bacterias hacen posible la síntesis de las proteínas que codifican

Se han construido muchos vectores plasmídicos y de bacteriófagos para hacer posible la expresión de genes eucarióticos en células bacterianas. Las bacterias en rápida replicación pueden ser útiles como factorías biológicas, para producir grandes cantidades de proteínas específicas con valor comercial, clínico y en investigación. A modo de ejemplo, mediante tecnologías recombinantes se han producido hormonas proteicas humanas, utilizables después como hormonas suplementarias o sustitutorias en pacientes con una producción hormonal anómala o inexistente. La Figura 7.22 muestra un vector plasmídico genérico para la expresión de un gen de mamífero. Recuérdese que el gen foráneo insertado ha de estar en forma de cDNA procedente del correspondiente mRNA, ya que el sistema bacteriano no puede eliminar los intrones del transcrito de mRNA primario. Cuando se crea una proteína de fusión, el DNA ha de insertarse en fase con los codones del extremo 3′ de la proteína bacteriana; es decir, para asegurar una traducción correcta, la inserción ha de producirse a continuación del triplete de un codón de la proteína bacteriana y al principio del triplete de un codón de la proteína del gen eucariótico. Por último, para obtener un transcrito funcional, el gen foráneo ha de insertarse en la orientación correcta en relación con el promotor. Esto puede conseguirse mediante clonación direccional.

Las proteínas eucarióticas sintetizadas en bacterias son a menudo inestables y son degradadas por proteasas intracelulares. Sin embargo, las proteínas de fusión son, normalmente, estables. Mediante procedimientos enzimáticos o químicos pueden eliminarse de la proteína de interés purificada los aminoácidos de la proteína de fusión codificados por el genoma procariótico. Una estrategia de clonación alternativa para solventar el problema de la inestabilidad intracelular de algunas pro-

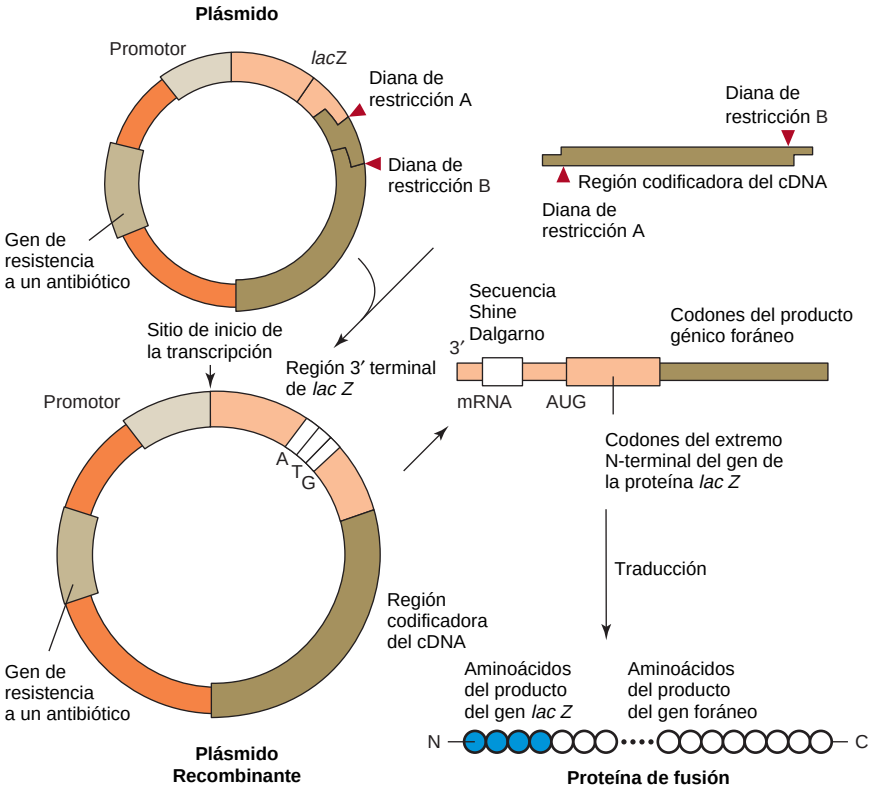


FIGURA 7.22
Construcción de un vector de expresión bacteriano.
Se inserta una región codificadora del cDNA de una proteína más abajo de las secuencias reguladoras bacterianas (promotor, P) del gen *lac*Z, la región que codifica la secuencia de Shine–Dalgarno del mRNA, el codón AUG y unos cuantos codones correspondientes a los aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína del gen *lacZ*. El mRNA producido por este vector de expresión dirige la síntesis en la bacteria de una proteína foránea que tiene en su extremo N-terminal unos cuantos aminoácidos de origen proteico bacteriano (una proteína de fusión).

teínas consiste en la producción de una proteína foránea que se secrete al medio. Para ello es necesario clonar el gen foráneo en un vector que permita que la proteína de fusión sintetizada contenga un péptido señal reconocido por la peptidasa señal bacteriana que modifica la proteína de forma apropiada para su secreción.

7.12 | VECTORES DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Las enfermedades genéticas de los mamíferos son el resultado de la carencia o alteración de proteínas intracelulares. Para utilizar técnicas recombinantes en el tratamiento de estas enfermedades, deben construirse vectores específicos que puedan incorporarse a las células de mamífero; además, estos vectores deben ser específicos para los tejidos o células que contengan la proteína aberrante. Numerosos vectores permiten la expresión de genes foráneos en células de mamífero en cultivo de tejidos. Estos vectores se han utilizado ampliamente para estudiar la síntesis y la maduración postraducción de proteínas en cultivos de células eucarióticas. Desgraciadamente, el éxito en la expresión selectiva de genes en tejidos específicos o en fases de desarrollo específicos dentro de un animal entero ha sido muy limitado.

Se han desarrollado varios tipos de **vectores de expresión** que permiten la replicación, transcripción y traducción de genes foráneos en células eucarióticas que crecen *in vitro*; entre ellos se incluyen vectores víricos de DNA y RNA que contienen un inserto de DNA foráneo. Estos vectores víricos son capaces de infectar una célula huésped y, a continuación, replicarse en ella. Los vectores construidos experimentalmente que contienen elementos de DNA esenciales, normalmente derivados de un genoma vírico, permiten la expresión de genes foráneos insertados. Los **vectores lanzadera** contienen señales de replicación tanto procarióticas como eucarióticas y, por lo tanto, permiten la replicación del vector tanto en bacterias como en células de mamífero. Un vector lanzadera permite clonar y purificar en gran cantidad un gen a partir del sistema bacteriano y, a continuación, expresar el mismo vector recombinante en células de mamífero. Algunos vectores de expresión se integran en el genoma de la célula huésped, mientras que otros se mantienen como entidades extracromosómicas (episomas), con expresión estable del gen recombi-

nante en las células hijas. Otros vectores de expresión se mantienen como DNA episómico, y sólo permiten la expresión transitoria del gen foráneo antes de la muerte de la célula.

El DNA foráneo, como el de los vectores de expresión víricos, puede introducirse en células eucarióticas en cultivo mediante **transfección**, un proceso análogo a la transformación de células bacterianas. Los métodos de transfección más comúnmente utilizados requieren la formación de un complejo de DNA y fosfato cálcico o dietilaminoetil (DEAE) dextrano, que es captado por la célula por endocitosis. Posteriormente, el DNA se transfiere del citoplasma al núcleo, donde se replica y expresa. Los detalles del mecanismo de transfección no se conocen. Ambos métodos se utilizan para la expresión transitoria, mientras que el procedimiento del fosfato cálcico se utiliza también para la expresión permanente de genes foráneos. Normalmente, mediante estos procedimientos puede transfectarse el 10–20% de las células en cultivo.

Elementos del DNA necesarios para la expresión de vectores en células de mamífero

La expresión de genes recombinantes en células de mamífero requiere la presencia en el vector de elementos de control que no son necesarios en los sistemas bacterianos. Para que se exprese en una célula eucariótica, el gen clonado se inserta en el vector en la orientación correcta en relación con los elementos de control, que incluyen un promotor, señales de poliadenilación y una secuencia potenciadora. La expresión puede mejorarse con la inclusión de un intrón. Alguno de estos elementos de DNA o todos ellos, pueden estar presentes en el gen recombinante si para la clonación se utiliza DNA genómico entero. Sin embargo, un determinado fragmento clonado, obtenido por corte con una endonucleasa de restricción, puede no contener los elementos de control necesarios. Un cDNA no posee estos elementos. Por lo tanto, es necesario que el vector de expresión que se vaya a utilizar en células de mamífero se construya de modo que contenga todos los elementos de control necesarios.

Un vector de expresión puede construirse insertando los elementos de control necesarios en el vector mediante técnicas recombinantes. Para una versatilidad óptima, los elementos promotores y potenciadores, introducidos en un vector de expresión, deberán ser reconocidos por una amplia variedad de células en cultivo. Para tal fin se utilizan los elementos de control derivados de virus con un gran número de huéspedes, como el **papovavirus**, el **virus 40 de los simios (SV40)**, el **virus del sarcoma de Rous** o el **citomegalovirus humano**.

El vector se ha de replicar, para aumentar el número de copias en cada célula, o para mantener las copias en las células hija. Por consiguiente, en la construcción del vector se incluyen secuencias de DNA que promueven su replicación en la célula eucariótica, y se conocen como el origen de replicación (ori). Factores proteicos específicos, codificados por genes introducidos en el vector o, con anterioridad, en el genoma del huésped, reconocen e interaccionan con las secuencias ori para iniciar la replicación del DNA.

Selección de células eucarióticas transfectadas mediante el uso de células mutantes que requieren nutrientes específicos

Es importante disponer de medios para cultivar selectivamente las células transfectadas, ya que a menudo éstas representan sólo el 10–20% de la población celular. Como en el caso de un plásmido bacteriano, en el vector puede incorporarse un gen que codifique un enzima que confiera resistencia a un fármaco o permita el crecimiento selectivo de las células que contengan el vector. La construcción de vectores que expresen tanto un marcador seleccionable como un gen foráneo es difícil. La **contransfección** soslaya este problema. Dos vectores diferentes se incorporan eficientemente a aquellas células susceptibles de ser transfectadas. En la mayoría de los casos, más del 90% de las células transfectadas contienen los dos vectores, uno con el marcador seleccionable y el otro con el gen de interés.

Dos de los marcadores seleccionables comúnmente utilizados son el gen de la timidina quinasa (*tk*) y el gen de la dihidrofolato reductasa. El producto del gen *tk*, la timidina quinasa, se expresa en la mayoría de las células de mamífero y participa en la ruta de recuperación de la timidina. Se han aislado varias líneas celulares mu-

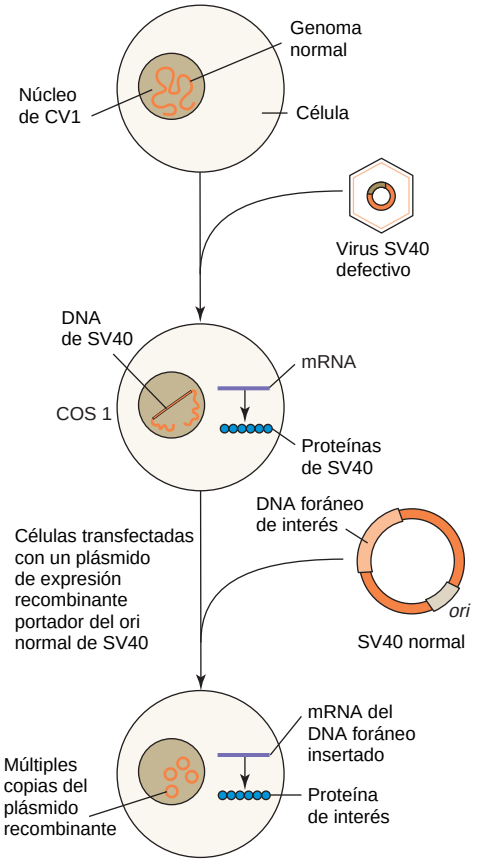


FIGURA 7.23
Expresión de genes foráneos en la células eucarióticas COS.
CV1, una línea celular establecida procedente de simios, puede infectarse y soportar la replicación lítica del virus de DNA de los simios, SV40. Las células se infectan con un mutante de SV40 defectivo en el origen de replicación (ori), cuyo DNA se integra permanentemente en el genoma de la célula huésped CV1. El DNA vírico defectivo codifica proteínas que pueden asociarse con un ori de SV40 normal para regular la replicación. Debido a su ori defectivo, el DNA vírico integrado no produce virus. Las proteínas de SV40 sintetizadas en la línea celular CV1 permanentemente modificada, COS-1, pueden, sin embargo, inducir la replicación, con un alto número de copias (hasta 10^5 moléculas por célula), de plásmidos recombinantes que lleven un ori de SV40 de tipo salvaje. La proteína foránea sintetizada en las células transfectadas puede detectarse inmunológica o enzimáticamente.

tantes que carecen de un gen timidina quinasa funcional (tk^-), por lo que no pueden sobrevivir en un medio de cultivo con hipoxantina, aminopterina y timidina. En este medio sólo crecen aquellas células mutantes tk^- cotransfectadas con un vector que contenga un gen *tk*, normalmente procedente del virus herpes simplex. En la mayoría de los casos, estas células se han cotransfectado con el gen de interés.

El gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) es necesario para mantener la concentración celular de tetrahidrofolato requerida para la biosíntesis de nucleótidos (véase la p. 855). Las células que carecen de este enzima sólo pueden sobrevivir en medios que contengan timidina, glicina y purinas. Por consiguiente, las células mutantes ($dhfr^-$) transfectadas con el gen *dhfr* pueden cultivarse selectivamente en un medio que carezca de estos suplementos. La expresión de genes foráneos en células mutantes, contransfectadas con marcadores seleccionables, está limitada a tipos celulares que pueden aislarse con el defecto génico requerido. Sin embargo, las células normales transfectadas con un vector que porta el gen *dhfr* también son resistentes a metotrexato, un inhibidor de la dihidrofolato reductasa, por lo que estas células pueden seleccionarse por crecimiento en metotrexato.

Otro método para seleccionar células no mutadas requiere la utilización en la cotransfección de un gen bacteriano que codifica la aminoglucósido 3′-fosfotransferasa (APH). Las células que expresan APH son resistentes a antibióticos aminoglucósidos tales como la neomicina y la kanamicina, que inhiben la síntesis proteica tanto en procariotas como en eucariotas. Los vectores que tienen un gen *APH* pueden utilizarse como marcadores seleccionables, tanto en células bacterianas como en células de mamífero.

Expresión de genes foráneos en células eucarióticas transformadas con virus

La Figura 7.23 muestra la expresión transitoria de un gen transfectado en células COS, uno de los sistemas más utilizados para expresar genes eucarióticos foráneos. Las células COS son células de simio que se mantienen en cultivo permanentemente, transformadas con un genoma de SV40 defectivo en el origen de replicación. El genoma vírico defectivo se ha integrado en el genoma de la célula huésped y expresa constantemente las proteínas víricas. No se producen los virus infectivos, que normalmente son líticos para las células infectadas, porque el origen de replicación vírico es defectivo. Las proteínas de SV40 expresadas por la célula COS transformada reconocen e interaccionan con un ori de SV40 normal contenido en un vector transfectado. Por lo tanto, estas proteínas de SV40 promueven la replicación reiterada del vector. El vector transfectado que contiene tanto un ori de SV40 como un gen de interés, puede alcanzar un número de copias superior a 10^5 moléculas por célula. Las células COS transfectadas mueren al cabo de 3–4 días, posiblemente por una sobrecarga del DNA vector episómico que resulta tóxica.

7.13 | MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Mediante la mutación de regiones seleccionadas o de nucleótidos individuales dentro del DNA clonado es posible definir el papel de las secuencias de DNA en la regulación génica y de las secuencias de aminoácidos en la función proteica. La **mutagénesis dirigida** consiste en la alteración controlada de determinadas regiones de una molécula de DNA. Puede implicar la inserción o deleción de determinadas secuencias de DNA, o bien la sustitución de un nucleótido específico con una base diferente. Varios métodos químicos mutan el DNA *in vitro* e *in vivo*, normalmente en sitios al azar dentro de la molécula.

Evaluación del papel de las regiones flanqueantes en el DNA mediante mutaciones de deleción e inserción

Puede llevarse a cabo mutagénesis dirigida en diversas regiones de una secuencia de DNA, en el propio gen o en sus regiones flanqueantes. La Figura 7.24 muestra una estrategia sencilla de mutación por deleción en la que la secuencia de interés es cortada selectivamente con una endonucleasa de restricción, con eliminación de las secuencias específicas, y en la que se recirculariza el vector recombinante mo-

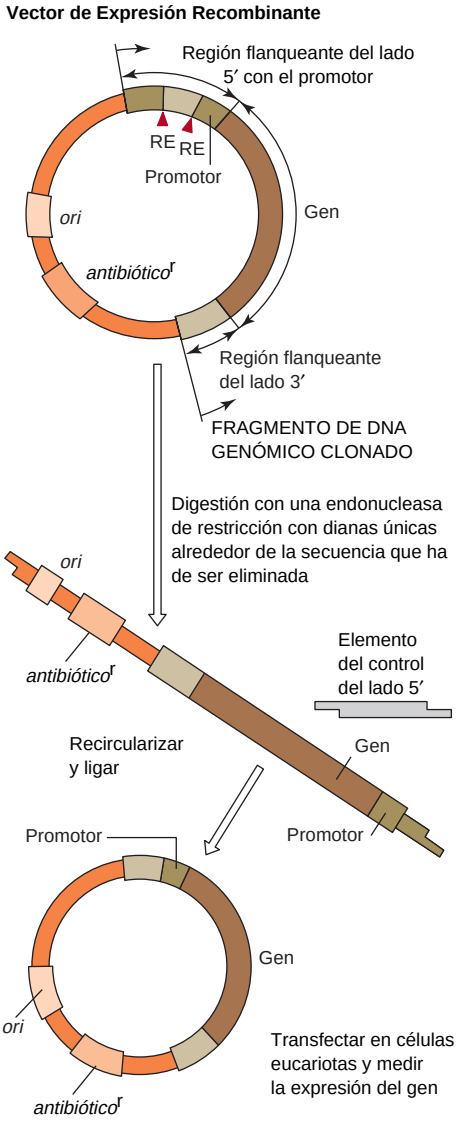


FIGURA 7.24
Uso de vectores de expresión para estudiar secuencias reguladoras de DNA. El gen de interés junto con las regiones flanqueantes de DNA de los lados 5′ y 3′ se inserta y clona en un vector de expresión, y se determina la expresión basal del gen en una célula apropiada. Pueden eliminarse determinadas regiones con secuencias reguladoras potenciales por corte con endonucleasas de restricción, y el vector de DNA recombinante truncado puede recicularizarse, ligarse y transfectarse a una célula huésped apropiada. Se determina el nivel de expresión génica en ausencia del regulador potencial, y se compara con controles para averiguar el papel regulador de la secuencia de DNA flanqueante eliminada.

dificado con DNA ligasa. El papel de la secuencia eliminada puede determinarse comparando el nivel de expresión (traducción) del producto génico, medido inmunológica o enzimáticamente, con la expresión del vector recombinante no modificado. Se utiliza una técnica similar para insertar secuencias nuevas en el sitio de corte. La deleción de una secuencia de DNA dentro de la región flanqueante de un gen clonado puede contribuir a la definición de su papel regulador en la expresión de un gen. La presencia o ausencia de una secuencia reguladora puede no ser suficiente para evaluar su papel en el control de la expresión. La disposición espacial de los elementos reguladores entre sí, respecto al gen y respecto a su promotor, puede ser importante en la regulación de la expresión génica (véase el Capítulo 8).

El análisis de secuencias potencialmente reguladoras se lleva a cabo satisfactoriamente mediante la inserción de la secuencia de interés más arriba de un gen indicador en un vector de expresión. Un gen indicador, habitualmente de origen procariótico, codifica un producto génico para el que existe un método de detección rápido y apropiado, que permite su fácil identificación entre las proteínas normalmente presentes en la célula no transfectada. Un gen indicador ampliamente utilizado es el gen bacteriano de la **cloramfenicol acetiltransferasa** (*CAT*). El producto del gen cataliza la acetilación e inactivación del cloramfenicol, un inhibidor de la síntesis proteica en células procarióticas. La determinación del nivel de acetilación del cloramfenicol en extractos preparados a partir de células transfectadas permite analizar la capacidad de un elemento regulador para potenciar o suprimir la expre-

sión del gen *CAT*. El elemento regulador puede mutarse antes de su inserción en el vector que lleva el gen indicador con objeto de establecer los requerimientos espaciales y de secuencia para su actuación como regulador de la expresión génica.

Una dificultad del análisis de los elementos reguladores es la ausencia de sitios de endonucleasas de restricción en posiciones útiles dentro del DNA clonado. En ausencia de sitios de restricción adecuadamente situados, las **mutaciones por deleción** pueden realizarse linealizando el DNA clonado con una endonucleasa de restricción más abajo de la secuencia reguladora potencial en estudio. A continuación, puede cortarse sistemáticamente el DNA con una exonucleasa que hidrolice nucleótidos desde el extremo libre de ambas cadenas del DNA linealizado. Tiempos de digestión más largos dan lugar a fragmentos de DNA más pequeños. La Figura 7.25 muestra cómo puede determinarse la actividad funcional de mutaciones por deleción mayores (que dan fragmentos más pequeños). La hidrólisis enzimática de la doble cadena de DNA se produce en ambos extremos del vector recombinante linealizado, destruyendo el sitio de restricción original (RE_2). Para manipulaciones posteriores encaminadas a evaluar la función de la secuencia eliminada, se restablece un sitio de restricción único, que permite recircularizar la molécula de DNA truncada. Esta operación se lleva a cabo ligando los extremos romos con un adaptador, un oligonucleótido sintético que contiene uno o más sitios para endonucleasas de restricción. Los adaptadores ligados se cortan con el enzima apropiado para proceder a la recircularización y ligación del DNA.

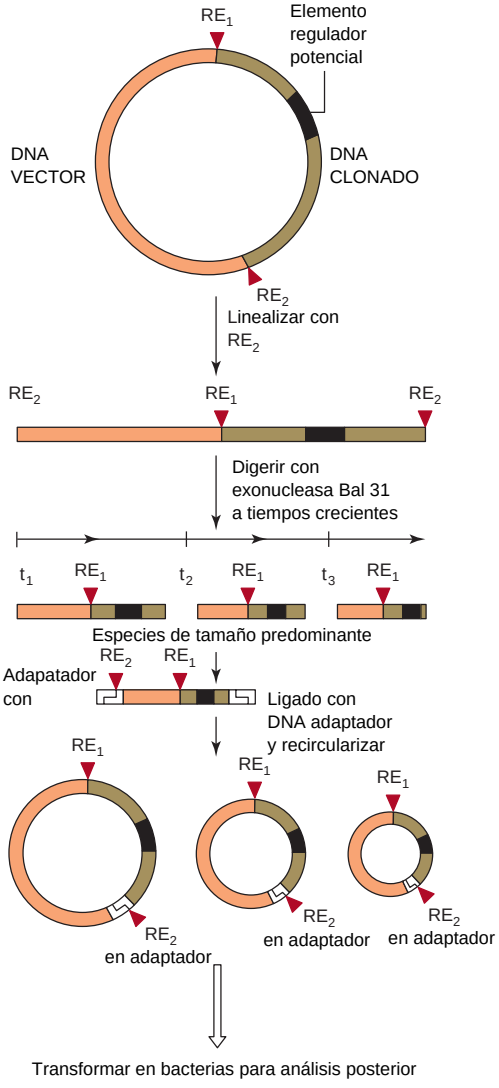
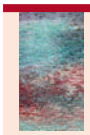


FIGURA 7.25
Modificación enzimática de secuencias de DNA potencialmente reguladoras. La molécula de DNA recombinante con un posible elemento regulador génico en las regiones de DNA flanqueantes se corta con una endonucleasa de restricción (RE_2). El DNA recombinante linealizado se digiere durante períodos de tiempo variables con la exonucleasa Bal31, que reduce el tamaño del DNA que flanquea al elemento regulador potencial. Se ligan pequeños oligómeros a las moléculas de DNA recombinante resultantes, de tamaños reducidos variables, que contengan la secuencia de la endonucleasa de restricción RE_2. El DNA adaptador modificado se hidroliza con RE_2, creándose extremos cohesivos de cadena sencilla complementarios que permiten la recircularización de los vectores recombinantes. El elemento regulador potencial, delimitado por secuencias de DNA flanqueantes con tamaños reducidos variables, puede amplificarse, purificarse, secuenciarse e insertarse en un vector de expresión en el lado 5′ de un gen competente. La modificación de la expresión del gen en una célula transfectada apropiada puede controlarse seguidamente para evaluar el papel del elemento regulador potencial situado a distancias variables del gen.



APLICACIÓN CLÍNICA 7.7
Mutagénesis dirigida del HSV I gD

El papel funcional y estructural de una cadena glucídica, unida covalentemente a una proteína puede estudiarse mediante mutagénesis dirigida. En primer lugar, ha de clonarse el gen que codifica una glucoproteína cuyo residuo(s) de asparagina está normalmente glucosilado (N-derivado). La glucoproteína D (gD) del virus herpes símplex de tipo I (HSV I) puede contener hasta tres grupos glucídicos. La gD de HSV I unida a la cubierta vírica parece desempeñar un papel central en la absorción y penetración del virus. Los grupos glucídicos pueden jugar un papel en estos procesos.

El gen clonado de la gD del HSV I se ha modificado por mutagénesis dirigida para alterar los codones de los residuos de asparagina en los tres sitios de glucosilación potenciales. Los genes mutados, clonados en un vector de expresión, se transfectaron en células eucarióticas (COS-1), en las que se expresó transitoriamente la proteína gD. La proteína gD de HSV I mutada, que carece de uno o de todos sus grupos glucídicos normales, puede analizarse con diferentes anticuerpos anti-gD monoclonales para determinar si se han modificado los epítopos inmunológicos (sitios específicos de una proteína que son reconocidos por un anticuerpo). La presencia de epítopos modificados indicaría que el residuo glucídico perdido estaba directamente relacionado con el sitio de reconocimiento normal o que tenía un papel en la conformación nativa de la proteína. Una conformación proteica modificada puede influir en la inmunogenicidad (p. ej., para vacunas) y en la maduración de la proteína (movimiento de la proteína desde el retículo endoplasmático, donde se sintetiza, hasta la membrana, a la que normalmente está unida). La mutación en dos de los sitios de glucosilación alteró la conformación nativa de la proteína, haciéndola menos reactiva frente a determinados anticuerpos monoclonales. La modificación de un tercer sitio no tuvo un efecto aparente sobre la estructura de la proteína, y la pérdida de la cadena glucídica en los tres sitios no impidió la maduración normal de la proteína.

Sodora, D. L., Cohen, G. H., y Eisenberg, R. J. Influence of asparagine-linked oligosaccharides on antigenicity, processing, and cell surface expression of herpes simplex virus type I glycoprotein D. *J. Virol.* 63:5184, 1989.

Mutagénesis dirigida de un único nucleótido

Los procedimientos anteriormente expuestos pueden ayudar a esclarecer el papel funcional de las secuencias de DNA, tanto pequeñas como grandes. Sin embargo, frecuentemente se desea evaluar el papel de un solo nucleótido en determinados sitios dentro de la molécula de DNA. Un cambio en una sola base permite la evaluación del papel de aminoácidos específicos en una proteína (véase la Apli. Clín. 7.7). Este método también permite crear o destruir un sitio de restricción en una posición específica dentro de una secuencia de DNA. La **mutagénesis dirigida** de un nucleótido específico es un proceso de múltiples etapas que empieza con la clonación del gen normal en un bacteriófago (Figura 7.26). Para estos estudios se utiliza habitualmente la serie M13 de vectores de bacteriófagos recombinantes. El M13 es un bacteriófago filamentoso que infecta específicamente a *E. coli* macho que expresan pelos sexuales codificados por un plásmido (el factor F). El bacteriófago M13 contiene DNA de cadena sencilla, o forma replicativa, que se replica a DNA de cadena doble dentro de las células infectadas. La forma de cadena doble del DNA se aísla de las células infectadas y se utiliza para clonar el gen que tiene que mutarse. Las calvas de interés pueden identificarse visualmente por complementación-α (véase la p. 295).

El M13 que contiene el gen de interés clonado se utiliza para infectar *E. coli* susceptibles. La descendencia de bacteriófagos que se libera en el medio de cultivo contiene DNA de cadena sencilla. Se sintetiza un oligonucleótido (de 18–30 nucleótidos de longitud) complementario a una región de interés, excepto en el nucleótido que se quiere mutar. Este oligómero, con una base desapareada, se hibrida con el gen de cadena sencilla clonado en la molécula de M13 y actúa de cebador. La extensión del cebador se lleva a cabo con la DNA polimerasa del bacteriófago T4; el DNA de cadena doble se utiliza para transformar células de *E. coli* sensibles al fago, en las que la cadena de DNA mutada actúa como molde para replicar nuevas cadenas (+) que ahora llevan el nucleótido mutado.

Las calvas de bacteriófago, que contienen el DNA mutado, se rastrean por hibridación con una sonda consistente en el oligonucleótido original marcado. Ajustando la temperatura de los lavados de la sonda hibridada, sólo permanecerá unido el híbrido perfectamente apareado, mientras que se disociará el complejo DNA nativo–oligómero con el nucleótido desapareado. A continuación, para confirmar la identidad de la mutación, el M13 portador del gen mutado se replica en bacterias, se purifica el DNA y se secuencia la región del gen mutada. Se han desarrollado numerosas modificaciones para mejorar la eficiencia de la mutagénesis dirigida de un solo nucleótido, incluido un método para replicar selectivamente la cadena mutada.

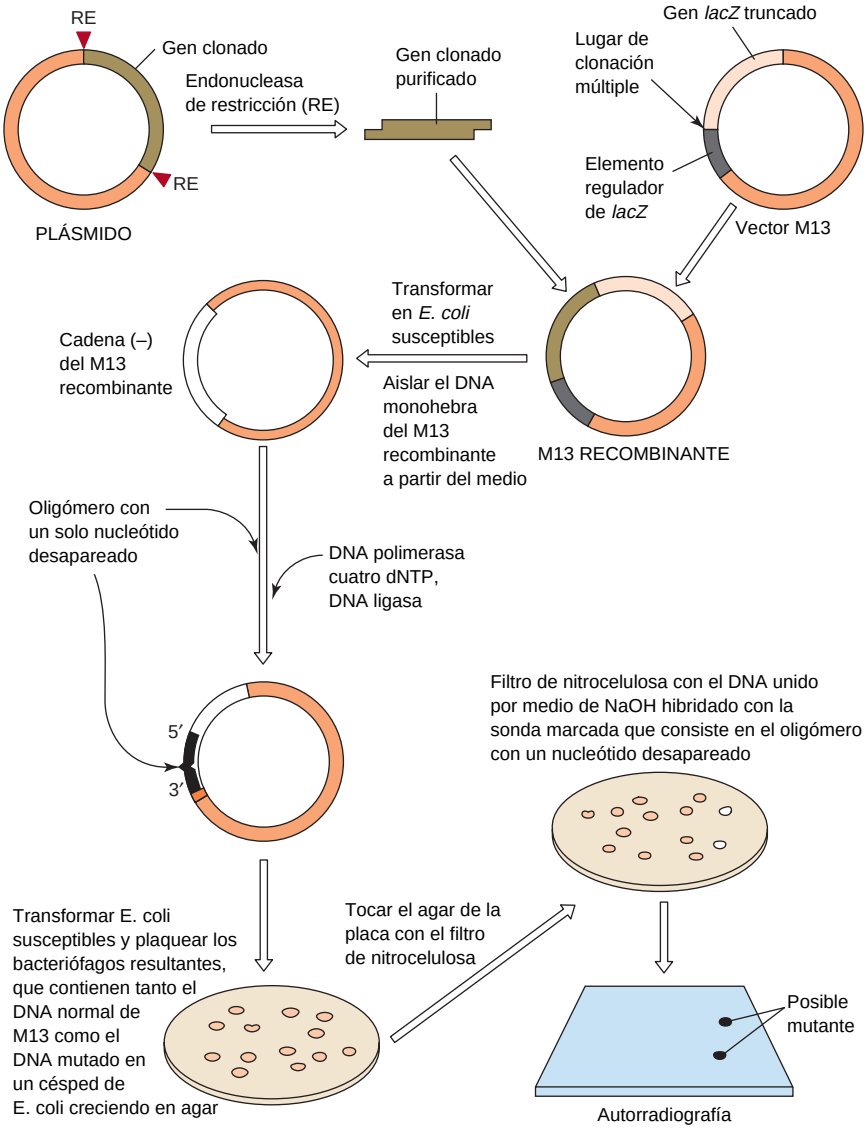


FIGURA 7.26
Mutagénesis dirigida de un único nucleótido y detección del DNA mutado.
La figura es una visión general simplificada del método. Este procedimiento requiere la inserción de un fragmento de DNA puro amplificado en un vector de bacteriófago modificado, M13. Células de *E. coli* susceptibles, transformadas con el DNA del M13 recombinante, sintetizan la cadena (+) del DNA empaquetado en las proteínas del virión. Se aíslan los bacteriófagos del medio de cultivo y se purifica el DNA de M13 recombinante de cadena sencilla. El DNA de M13 recombinante actúa de molde para la replicación del DNA en presencia de DNA polimerasa, desoxinucleósidos trifosfato (dNTP), DNA ligasa y un cebador especial. El DNA cebador (oligómero desapareado) se sintetiza para que sea complementario de una región del DNA (gen) de interés, excepto en la base que se desea modificar (mutar). Por consiguiente, el DNA de M13 sintetizado de nuevo contiene una base específicamente mutada que, una vez reintroducida en *E. coli* susceptibles, será replicada fielmente. Las *E. coli* transformadas se cultivan sobre placas de agar, y las colonias resultantes se replican sobre un filtro de nitrocelulosa. Se desnaturaliza el DNA asociado a cada colonia, se fija al filtro con NaOH, y el DNA unido al filtro se hibrida con una sonda del oligómero de DNA desapareado marcada con ^{32}P. A continuación, se identifican los presuntos mutantes exponiendo el filtro a película de rayos X.

El bacteriófago M13, replicado en una cepa de *E. coli* mutante, incorpora en su DNA algunos residuos de uracilo en lugar de timina, debido a un defecto metabólico en la síntesis de dTTP a partir de dUTP, y a la carencia de un enzima que normalmente elimina los residuos de uracilo del DNA. El DNA de M13 de cadena sencilla que contiene uracilo se purifica y se hibrida con un oligómero complementario que contiene una base desapareada en el nucleótido que va a mutarse. El oligómero actúa como cebador de la replicación del DNA *in vitro* con la cadena molde (+) que contiene uracilos, y con la nueva cadena (−) que contiene timinas. Cuando este DNA de M13 de cadena doble se usa para transformar *E. coli* de tipo salvaje, se destruye la cadena que contiene uracilo y la cadena (−) mutada actúa de molde para la descendencia de bacteriófagos, la mayoría de los cuales llevarán la mutación de interés.

La PCR también puede emplearse para la mutagénesis dirigida. Se han desarrollado estrategias que permiten incorporar una base desapareada en uno de los oligonucleótidos cebadores de la PCR. Algunos de estos procedimientos emplean el bacteriófago M13 y se basan en los principios descritos en la Figura 7.26. Una variación de estos métodos de PCR es la **mutagénesis por PCR inversa**, que ha sido aplicada a pequeños plásmidos recombinantes (4–5 kb) (Figura 7.27). Este método es muy rápido y eficiente, ya que entre el 50 y el 100% de las colonias que se obtienen son portadoras de la secuencia mutada. Los dos cebadores, uno de los cuales lleva la base desparedada, se sintetizan de tal manera que, una vez hibridados con el molde, sus extremos 5′ queden situados el uno frente al otro.

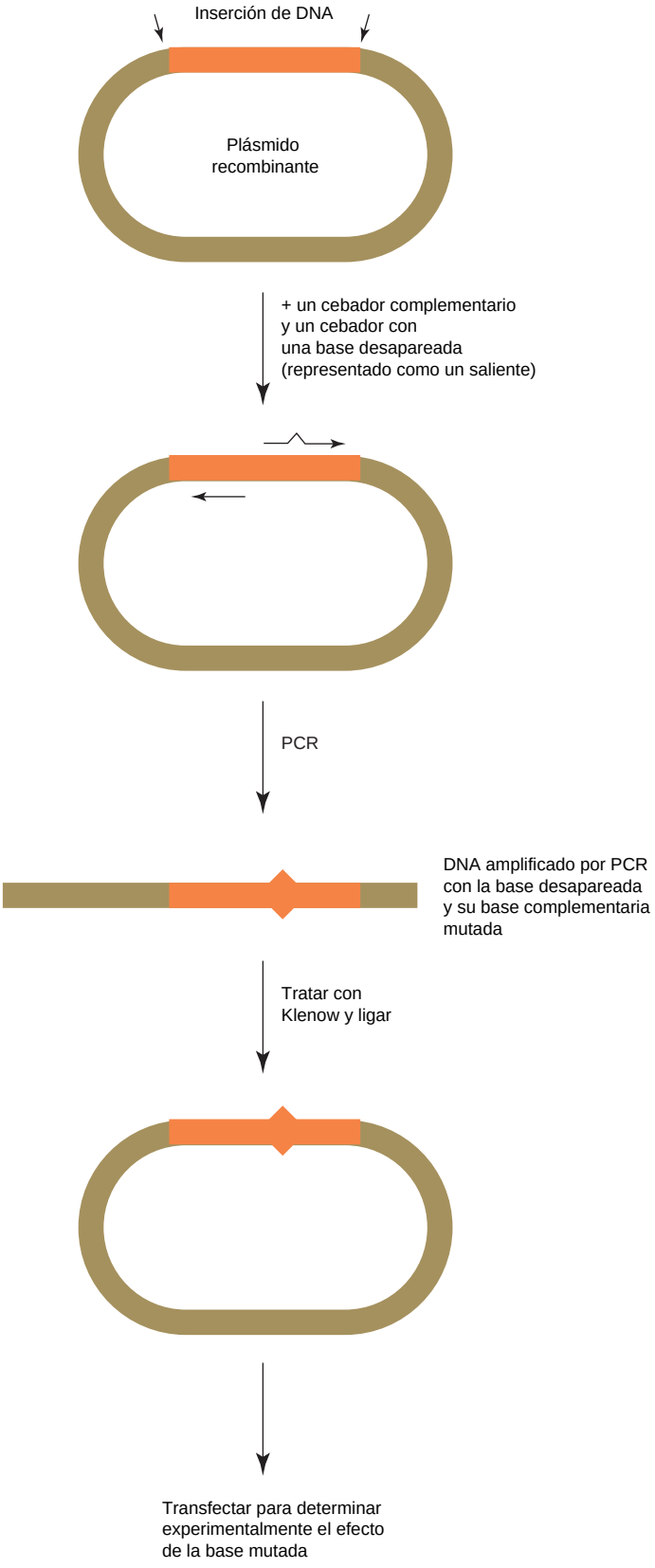


FIGURA 7.27
Mutagénesis por PCR inversa.
Mediante PCR inversa puede mutarse una sola base del DNA en plásmidos recombinantes. Se sintetizan dos cebadores con extremos 5′ antiparalelos complementarios a bases adyacentes en las dos hebras de DNA. Uno de los dos cebadores lleva una base específica desapareada que se copia fielmente en todos los ciclos de amplificación de la PCR, dando lugar finalmente a un plásmido recombinante con una sola base mutada.

7.14 APLICACIONES DE LAS TECNOLOGÍAS DEL DNA RECOMBINANTE

Las aplicaciónes prácticas de los métodos del DNA recombinante a los sistemas biológicos están limitadas solamente por la propia imaginación. Los métodos de DNA recombinante se pueden aplicar a numerosas disciplinas biológicas, entre ellas la agricultura, estudios de evolución, biología forense y medicina clínica. La ingeniería genética puede introducir proteínas nuevas o modificadas en cultivos (p. ej. el maíz), para que contengan aminoácidos esenciales para el ser humano, de los que a menudo carecen las proteínas vegetales. Toxinas, que son letales para insectos específicos, pero inofensivas para el hombre, pueden introducirse en los cultivos para proteger las plantas sin necesidad de emplear pesticidas que destruyan el medio ambiente. La presencia o ausencia de defectos genéticos en el feto puede analizarse a partir del DNA aislado de células tomadas del líquido amniótico de una mujer embarazada. A partir de muestras biológicas que se han conservado en antiguos pozos de alquitrán o en la tundra helada, pueden aislarse, amplificarse y secuenciarse minúsculas cantidades de DNA para estudios evolutivos a nivel molecular. Como ayuda en la identificación de delincuentes, el DNA de un solo pelo, de una gota de sangre o del esperma hallado en el cuerpo de una víctima de violación puede ser aislado, amplificado y mapeado. Las tecnologías actuales deberían, en combinación con métodos futuros, permitir la introducción selectiva de genes en células con genes defectivos o ausentes. También es probable que se disponga de metodologías para introducir secuencias de ácido nucleico en células específicas con el objetivo de cancelar selectivamente la expresión de genes perjudiciales.

Los ácidos nucleicos antisentido como herramientas de investigación y como agentes terapéuticos

Recientemente se ha introducido una nueva herramienta, los **ácidos nucleicos antisentido** (RNA o DNA), para estudiar la expresión intracelular y la función de proteínas específicas. Los ácidos nucleicos antisentido naturales y sintéticos, que son complementarios del mRNA, se hibridan en el interior de la célula, inactivan el mRNA y bloquean la traducción. La introducción de ácidos nucleicos antisentido en células ha abierto nuevos caminos para explorar el modo de funcionamiento de las proteínas, cuya expresión ha sido selectivamente reprimida en una célula. Este método también resulta muy prometedor para el control de infecciones víricas. La tecnología de los ácidos nucleicos antisentido junto con la mutagénesis dirigida son parte de una nueva disciplina denominada **genética inversa**. La genética inversa (del gen al fenotipo) modifica selectivamente un gen para evaluar su función, en contraposición a la genética clásica, que depende del aislamiento y análisis de células que lleven mutaciones al azar que puedan ser identificadas. Una segunda acepción del término genética inversa se refiere a la obtención de mapas y, en última instancia, la clonación de un gen humano asociado con una enfermedad de la que no se conocen con anterioridad los agentes moleculares que la causan. En este último caso es probable que el uso del término "genética inversa" sea revisado.

El RNA antisentido puede introducirse en una célula mediante técnicas de clonación habituales. La Figura 7.28 muestra un de los métodos disponibles. Un gen se clona en un vector de expresión en la orientación incorrecta; es decir, la cadena codificadora o con sentido, que normalmente se insertaría en el vector de expresión más abajo del promotor, se inserta intencionadamente en dirección opuesta. La cadena complementaria o antisentido del DNA queda, así, bajo el control del promotor, lo que da lugar a un RNA antisentido. La transfección de células con el vector de expresión antisentido introduce RNA antisentido, que es capaz de hibridarse con el mRNA normal de la célula. El complejo mRNA–RNA antisentido no se traduce por varios motivos, entre ellos, su incapacidad para unirse a los ribosomas, el bloqueo de la maduración normal y la rápida degradación enzimática.

También se han sintetizado oligonucleótidos de DNA, complementarios de la secuencia conocida de mRNA de un gen seleccionado. La introducción de oligómeros de DNA específicos en células en cultivo ha logrado inhibir infecciones víricas, entre ellas la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se puede pensar que llegará un día en el que se tomarán células de médula ósea de

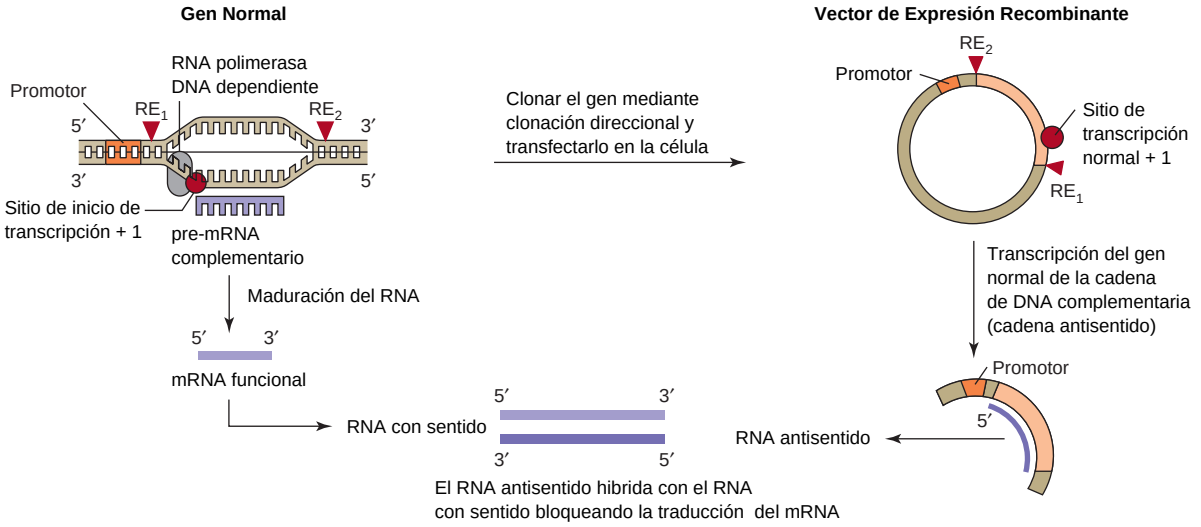


FIGURA 7.28
Producción de RNA antisentido.
Se inserta un gen, o una parte del mismo, en un vector mediante clonación direccional en el lado 3′ de un promotor y con orientación inversa a la normalmente presente en la célula de origen. La transfección de este DNA recombinante en la célula paterna que lleva el gen normal, da lugar a la transcripción de RNA a partir del DNA con polaridad inversa (RNA antisentido), junto con un transcrito de mRNA celular normal (RNA con sentido). Los dos RNA complementarios antiparalelos se pueden hibridar dentro de la célula bloqueando la expresión (traducción) del transcrito de mRNA normal.

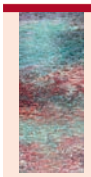
pacientes con SIDA y se introducirán ácidos nucleicos antisentido del virus VIH en cultivos de estas células. Estas células "protegidas" podrían reintroducirse en la médula ósea del paciente de SIDA (transplante autólogo de médula ósea), y así sustituir a las células que el virus destruye normalmente. Asimismo, se están realizando progresos experimentales con ácidos nucleicos antisentido que pueden regular la expresión de oncogenes, genes implicados en el proceso de formación del cáncer. El aprovechamiento de la tecnología de los ácidos nucleicos antisentido es muy prometedora en el tratamiento de enfermedades humanas.

Se pueden introducir genes normales en células con genes defectuosos: terapia génica

A veces, es deseable que el DNA transfectado se replique en un alto número de copias independientemente del ciclo celular. En otras situaciones es preferible que una o unas pocas copias del DNA transfectado se integren en el genoma del huésped y que su replicación quede regulada por el ciclo celular. Los individuos que poseen un gen defectuoso, y que por ello presentan alguna enfermedad, podrían tratarse, en teoría, suplementado sus células con el gen normal. La **terapia génica** está en su infancia; no obstante, mediante el uso de vectores retrovíricos es posible conseguir con éxito la transferencia de genes al ser humano (véase la Apli. Clín. 7.8). El éxito de la transferencia génica depende en parte de la integración del gen en el genoma del huésped, la cual está dirigida por el sistema de integración del retrovirus. No obstante, la integración es normalmente un suceso aleatorio, que puede producir secuelas perjudiciales. Estudios muy interesantes indican que la maquinaria vírica puede ser "dirigida" selectivamente hacia secuencias diana específicas del DNA huésped mediante interacciones proteína–proteína para obviar estos problemas potenciales.

El DNA recombinante tiene un importante impacto comercial en agricultura

Tal vez la mayor ventaja para la humanidad de las técnicas del DNA recombinante sería su uso para mejorar las cosechas. Para ello será necesario identificar y aislar genes que codifiquen propiedades como un mayor rendimiento de la cosecha, un rápido crecimiento de la planta, la resistencia frente a condiciones adversas, tales como la aridez y el frío, y el tamaño de la planta. Se podrían introducir nuevos genes, no comunes en plantas, para conferirles resistencia a insectos, hongos o bacte-



APLICACIÓN CLÍNICA 7.8

En la terapia génica se introducen genes normales en células con genes defectuosos

Se conocen más de 4000 enfermedades genéticas diferentes, muchas de las cuales son debilitadoras o fatales. La mayoría son incurables. Con las nuevas técnicas de biología molecular, la aplicación clínica de la transferencia de genes y la terapia génica se están convirtiendo en una realidad. La deficiencia en adenosina desaminasa (ADA) y una mutación en un gen que codifica una subunidad de varias citoquinas, γ_c, son sólo dos de las muchas enfermedades genéticas que pueden curarse fácilmente por terapia génica.

La ADA es un enzima importante de la ruta de recuperación de las purinas y cataliza la conversión de la adenosina en inosina o de la desoxiadenosina en desoxiinosina. Es una proteína de 363 aminoácidos con una alta actividad en el timo y otros tejidos linfáticos. La enfermedad se hereda como un trastorno autosómico recesivo. Hay más de 30 mutaciones asociadas a esta enfermedad. La deficiencia de ADA causa, mediante un mecanismo desconocido, una grave inmunodeficiencia combinada (SCID). Estos niños inmunodeficientes mueren normalmente en los primeros años de vida a causa de infecciones múltiples. La primera terapia génica autorizada en el hombre empezó el 14 de Septiembre de 1990 con el tratamiento de una niña de cuatro años con deficiencia de ADA. Las células T de la sangre periférica de la paciente se multiplicaron en cultivo con los factores de crecimiento adecuados. El gen *ADA* se introdujo en el interior de estas células mediante transferencia génica facilitada por un retrovirus. Para ello se construyó un retrovirus modificado, que contenía el gen humano *ADA*, que pudiera expresar el gen pero sin replicarse. (Estos virus que no pueden replicarse fueron propagados primero en una línea celular que contenía un virus asistente integrado que permitía la producción de virus "infecciosos". Estos virus "infecciosos" con la información genética foránea pueden infectar y transmitir información a células sin virus asistentes, pero no pueden replicarse en ellas.) La transferencia génica del gen *ADA* fue realizada por medio de una infección retrovírico de las células T de la paciente. Las células T modificadas que eran portadoras del gen *ADA* normal fueron reintroducidas en la sangre de la paciente mediante transfusión autóloga. Niveles de ADA de tan sólo un 10% son suficientes para normalizar al paciente. El paciente, que ya tiene 13 años, está vivo y bien y ha mantenido las células T circulantes corregidas en su gen a un nivel del 20-25% del total de células T.

El trastorno hereditario, SCID-X1, ligado al cromosoma X, provoca el bloqueo de la diferenciación de los linfocitos T y de las células agresoras naturales (NK). El SCID-X1 resulta de una mutación en la subunidad γ_c de la citoquina, común a los receptores de las interleuquinas -2, -4, -7, -9 y –15. La metodología del tratamiento de pacientes de 8 y 11 meses fue similar a la empleada para los pacientes de SCID deficientes en ADA, que suele ser una enfermedad menos severa que el SCDI-X1. A diferencia de anteriores estudios que utilizaron células T maduras, los estudios sobre el SCDI-X1 introdujeron el vector retrovírico con el cDNA normal de la γ_c en células madre $CD34^+$. El resultado fue un nivel de transducción del gen mucho más alto que el observado en estudios anteriores. Ambos niños al cabo de tres meses recobraron un nivel de funcionamiento del sistema inmunitario suficiente para abandonar el aislamiento protector del hospital.

Blaese, R. M. Progress toward gene therapy. *Clin. Immunol Immunopathol.* 61:574, 1991; Mitani, K., Wakamiya, M., y Caskey, C.T., Long-term expression of retroviral-transduced adenosine deaminase in human primitive hematopoietic progenitors. *Hum. Gene Ther.* 4:9, 1993; Anderson, W. F. The best of times, the worst of times. *Science* 288:627, 2000; Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.-L., Bousso, P., Le Deist, F. y Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669, 2000.

rias. Por último, podrían modificarse genes que codificaran proteínas estructurales ya existentes, para que contengan aminoácidos esenciales, normalmente ausentes en la planta, sin modificar la función de la proteína. La posibilidad de producir plantas con propiedades genéticas nuevas depende de la capacidad de introducir genes en células vegetales que puedan desarrollarse en plantas enteras.

La información genética nueva contenida en los plásmidos de agalla vegetales puede introducirse en plantas infectadas con bacterias del suelo conocidas como agrobacterias. Las agrobacterias contienen normalmente un plásmido de agalla o Ti (inductor de tumores), cuyos genes se integran en un cromosoma de la célula infectada. Los genes del plásmido dirigen la producción de nuevos aminoácidos necesarios para el crecimiento bacteriano. En el sitio de la infección bacteriana se desarrolla una agalla o masa tumoral de células indiferenciadas. En el plásmido Ti pueden introducirse nuevos genes y, tras infección con la agrobacteria, puede también introducirse el plásmido recombinante en células de la planta. Las células vegetales transformadas pueden entonces cultivarse y, en condiciones apropiadas, ser inducidas a la rediferenciación en plantas enteras. Cada célula contiene la nueva información genética y representa una planta transgénica.

Antes de que se produzcan avances significativos en nuestras fuentes de alimento, han de superarse algunas limitaciones en la producción de plantas con propiedades genéticas mejoradas. Está claro que todavía se han de identificar y aislar los genes apropiados para obtener las características deseadas. Además, cultivos importantes como el del maíz y el del trigo no pueden transformarse con plásmidos Ti y, por consiguiente, han de identificarse otros vectores. No obstante, en los últimos años se han conseguido éxitos significativos en el diseño de plantas de maíz resistentes a insectos y virus. También ha sido importante el reciente logro de la ingeneria genética, con-

sistente en la introducción de un gen foráneo en plantas del guisante, que ahora producen un proteína que impide que la larva del gorgojo se alimente de los guisantes. De esta manera, los guisantes y otras legumbres se podrán almacenar sin necesidad de fumigarlos con productos químicos protectores (actualmente los granjeros brasileños pierden el 20–40% de sus cosechas de judías a causa de las plagas).

7.15 TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AL ANIMAL ENTERO

Hasta aquí hemos descrito muchos sistemas *in vitro* e intracelulares para facilitar la purificación, la secuenciación y la modificación de genes o de sus cDNA y regiones flanqueantes con funciones potencialmente reguladoras. Se han desarrollado y mejorado métodos durante los 90 que permiten la introducción de genes foráneos en el animal entero o la deleción de un gen del genoma con objeto de averiguar la función del gen *in vivo*. Finalmente, se dispone de métodos para clonar animales enteros. Aunque la aplicación de estas metodologías no está exenta de problemas bioéticos e incertidumbres, los métodos en sí mismos auguran un brillante futuro para las técnicas de terapia génica.

Animales transgénicos

Los métodos del DNA recombinante permiten obtener grandes cantidades de productos génicos foráneos en bacterias y células en cultivo. Estos métodos también facilitan la evaluación del papel que desempeña un producto génico específico en la estructura o función celular. Para investigar el papel de un determinado producto génico en el crecimiento y desarrollo de un animal entero, el gen ha de introducirse en el óvulo fertilizado. En el genoma de un óvulo fertilizado pueden insertarse genes foráneos. Los animales que se desarrollan a partir de un óvulo fertilizado con un gen foráneo insertado llevan este gen en cada célula y se conocen como **animales transgénicos**.

La Figura 7.29 resume el método más comúnmente utilizado para crear animales transgénicos. El gen de interés es normalmente una molécula de DNA recombinante clonada, que incluye su propio promotor o que está clonada en una construcción con un promotor distinto que puede regularse selectivamente. En el pronúcleo del óvulo fertilizado se microinyectan múltiples copias del gen foráneo. El DNA foráneo se inserta en el DNA cromosómico al azar. Si el inserto interrumpe un gen celular crítico, el embrión morirá. Normalmente, la inserción de DNA foráneo en el cromosoma da lugar a procesos mutagénicos no letales.

Actualmente, los animales transgénicos se utilizan para estudiar diversos aspectos del gen foráneo, tales como el análisis de elementos reguladores del DNA, la expresión de proteínas durante la diferenciación, la especificidad de tejido y el papel potencial de productos de oncogenes sobre el crecimiento, diferenciación e inducción de tumores. Finalmente, se espera que éstas y otras tecnologías relacionadas permitirán poner a punto métodos para sustituir genes defectivos en embriones en desarrollo (véase la Apli. Clín. 7.9).

Ratones genosuprimidos

La creación de un animal con un gen determinado "destruido" en todas sus células permite que los investigadores definan el papel del gen, siempre que su pérdida no sea letal. Los principios básicos de la preparación de **ratones genosuprimidos** consisten en inactivar un gen recombinante purificado, introducir el gen alterado en células madre embrionarias (ES) para que reemplace al gen normal, inyectar las células ES modificadas en un blastocisto en desarrollo, implantar el blastocisto en una madre adoptiva y seleccionar la descendencia que carezca del gen normal. El método habitual para inactivar un gen seleccionado es introducir un gen de resistencia a antibiótico, conocido como *neo*, en el gen clonado. De esta forma, se consigue a la vez inactivar el gen e identificar/seleccionar las células ES que han sido transfectadas con éxito con el gen alterado. El gen normal es reemplazado por el gen interrumpido por *neo* en un pequeño porcentaje de células ES, mediante un proceso conocido por **recombinación homóloga**. Las secuencias nucleótidicas del gen alterado/interrumpido

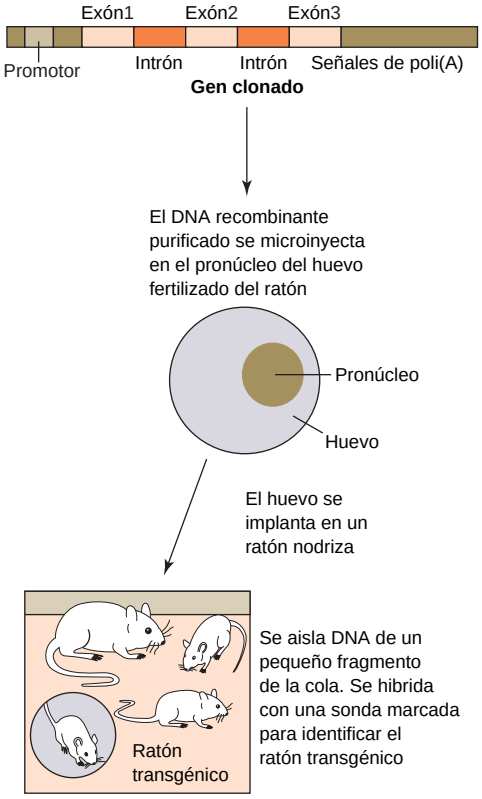
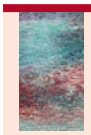


FIGURA 7.29
Producción de animales transgénicos. Se microinyectan genes funcionales clonados, amplificados y purificados en pronúcleos de óvulos de ratón fertilizados *in vitro*. Los óvulos se implantan en una madre adoptiva. Se aísla el DNA a partir de un pequeño trozo de cola de cada una de las crías, y, para identificar los animales que lleven el gen foráneo (animales transgénicos), éste se hibrida con una sonda marcada. Los ratones transgénicos pueden aparearse para establecer una nueva cepa de ratones. A partir de tejidos de ratones transgénicos también pueden establecerse líneas celulares para estudiar la regulación génica y la relación estructura/función del producto génico foráneo.



APLICACIÓN CLÍNICA 7.9
Modelos de animales transgénicos

Los sistemas modelo de animales transgénicos hacen suponer que futuras metodologías puedan corregir enfermedades genéticas en las fases tempranas del desarrollo fetal. Estos animales se utilizan para estudiar la regulación de la expresión y la función de determinados productos génicos en el animal entero con el objetivo de, en un futuro próximo, crear nuevas líneas de animales con fines comerciales. Se han desarrollado ratones transgénicos a partir de óvulos de ratón fertilizados, en cuyos pronúcleos masculinos se micoinyectaron genes de la hormona del crecimiento (*GH*) de rata (véase p. 321). El DNA del gen de la *GH* de rata, fusionado a la región promotora de la metalotioneína-I (MT-I) de ratón, se purificó a partir del plásmido en el que se había clonado. Se introdujeron aproximadamente 600 copias del complejo promotor–gen en cada uno de los óvulos, que se insertaron a continuación en el tracto reproductivo de un ratón que actuaba de madre adoptiva. Mediante hibridación de una sonda marcada de DNA con el DNA del ratón, purificado a partir de un pequeño fragmento de la cola, y después digerido con una endonucleasa de restricción, separado por electroforesis y finalmente transferido a un filtro por el método de Southern, se demostró que el genoma del ratón transgénico resultante contenía el gen *GH* de rata. La dieta de los animales se suplementó con $ZnSO_4$ a los 33 días después del parto. El $ZnSO_4$ activa probablemente el promotor MT-I de ratón, iniciándo así la transcripción del gen *GH* de rata. En algunos animales transgénicos, la continua sobre expresión del *GH* de rata dio lugar a ratones con un tamaño aproximadamente el doble del que presentaban sus compañeros de camada que no tenían el gen *GH* de rata. Un ratón transgénico transmitió el gen *GH* de rata a la mitad de su descendencia, lo que indicaba que el gen se había integrado de forma estable en el genoma de las células germinales y que podían crearse nuevas líneas de animales.

Palmiter, R. D., et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611, 1982.

se alinean con la secuencia homóloga del gen normal e intercambian posiciones, o se insertan en el gen normal. La selección de las células ES alteradas, la microinyección de blastocisto de ratón, el nacimiento de la descendencia quimérica, y la reproducción de la descendencia homocigótica para el gen alterado (Figura 7.30) es un pro-

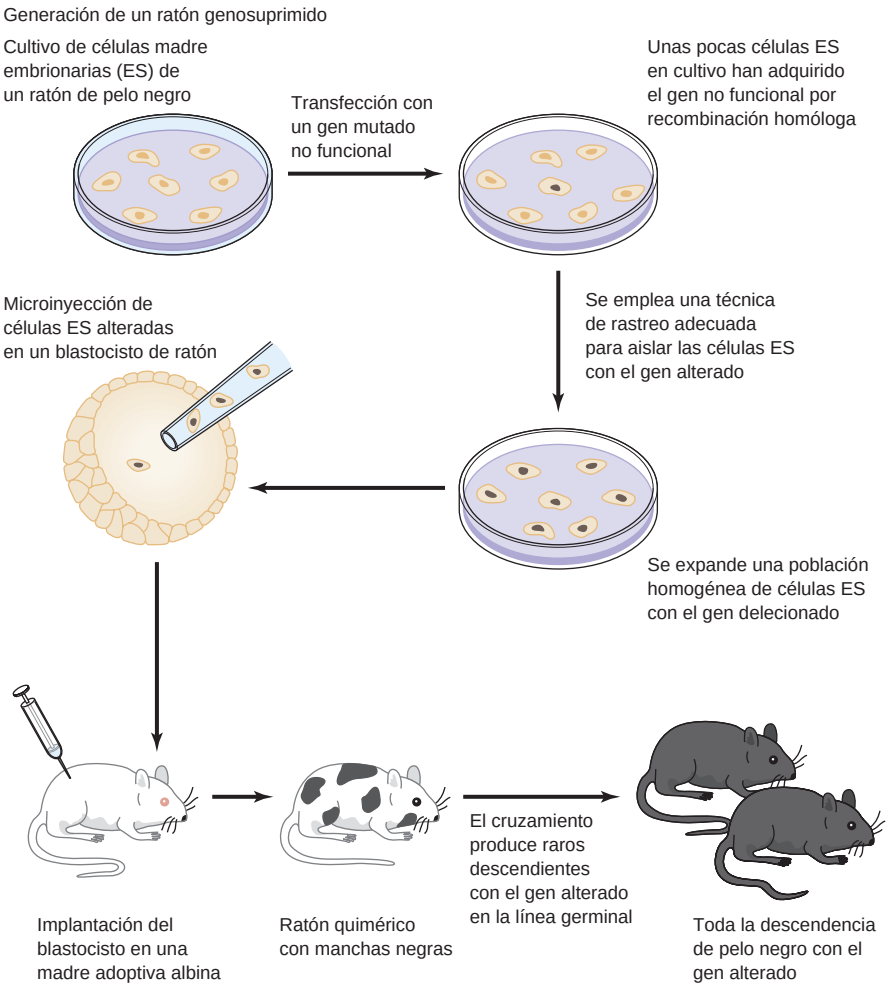
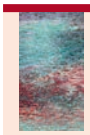


FIGURA 7.30
Generación de ratones genosuprimidos. Las células embrionarias en cultivo pueden manipularse mediante técnicas recombinates para que presenten un gen defectivo o "delecionado". Estas células alteradas pueden ser introducidas en un blastocisto, que después es introducido en una madre adoptiva. Es posible seleccionar la descendencia que posea el gen no funcional "delecionado" en todas sus células, es decir los animales genosuprimidos.



APLICACIÓN CLÍNICA 7.10

Los ratones genosuprimidos definen el papel del purinorreceptor $P2Y_1$

Las plaquetas juegan un papel central en la homeostasis y en la trombosis. El ADP es un importante agonista fisiológico que induce agregación plaquetaria. En los años 70 se estableció el dogma de que el ADP inducía la agregación al unirse a un único receptor acoplado a proteína G, mientras que el ATP extracelular, actuando sobre el mismo receptor, inhibía competitivamente la reacción. A veces las ideas basadas en pruebas limitadas tardan años en ser modificadas. En los años 90 se supo que las plaquetas, de hecho, poseen al menos tres purinorreceptores con diferentes especificidades por el ATP en relación con el ADP. La comprensión del funcionamiento de estos receptores potencialmente interactivos es muy importante clínicamente. El ATP y el ADP son liberados en el sistema cardivascular en una amplia variedad de condiciones normales y patológicas. El balance entre la acción agonista del ADP y la acción del ATP puede jugar un papel significativo en la regulación de las respuestas de las plaquetas. El conocimiento de los mecanismos de acción puede permitir el diseño de nuevos fármacos para combatir las trombosis. El desarrollo reciente de un modelo de ratones genosuprimidos ha permitido establecer el papel de uno de los receptores de purinas, el $P2Y_1$.

Aunque el receptor $P2Y_1$ se encuentra en muchos otros tejidos, además de las plaquetas, los ratones genosuprimidos no presentaban anormalidades aparentes. Sin embargo, los niveles normales de ADP no eran capaces de inducir agregación plaquetaria en muestras derivadas de estos animales, mientras que elevadas concentraciones de ADP eran efectivas. Cuando estas plaquetas agregaron en presencia de altas concentraciones de agonista, el proceso no estuvo acompañado por el cambio habitual de la forma de las plaquetas. Se observó que estos ratones carentes de $P2Y_1$ eran resistentes al tromboembolismo, por tanto, este receptor podría ser una buena diana de fármacos contra la trombosis.

Soslau, G. and Youngprapakorn, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 1355:131, 1997; and Leon, C., Hechler, G., Freund, M., Eckly, A., Vial C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeus, M., Cazenave, J.-P., and Gachet, C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic $P2Y_1$ receptor-null mice. *J. Clin. Invest.* 104:1731, 1999.

ceso extraordinariamente laborioso. Hasta la fecha, este método ha sido aplicado en numerosos experimentos para evaluar el papel de determinados genes como el **purinorreceptor** $P2Y_1$ (véase la Apli. Clín. 7.10).

Dolly, una oveja clonada a partir de una célula adulta

La **clonación** de animales plantea numerosos problemas éticos, como son: ¿Está la humanidad autorizada para seleccionar la composición genética de los animales y a propagarlos? Está claro que el desarrollo de animales con idéntica información genética ofrece muchas ventajas experimentales. Sin embargo, la mayoría considera éticamente inaceptable extender las técnicas de clonación a los humanos.

La clonación de descendencia viable a partir de células adultas de mamífero es extraordinariamente laboriosa. El método utilizado para generar a "Dolly", la oveja clonada, comenzó con el cultivo de células de células procedentes de la glándula mamaria de una oveja Finn Dorset de seis años. Las células fueron detenidas en G_o, manteniéndolas en un medio de cultivo de bajo contenido en suero. Los núcleos de las células diploides quiescentes fueron transferidos a oocitos anucleados procedentes de una oveja escocesa Blackface. Los óvulos fertilizados artificialmente se desarrollaron en cultivo hasta el estadio de mórula o de blastocisto y luego transferidos a una oveja receptora para completar el desarrollo embrionario. Sólo un pequeño número de los embriones implantados llegan a término. No obstante, la metodología para la clonación a partir de células somáticas adultas se ha aplicado con éxito a ovinos, ratones y monos.

7.16 | CONSIDERACIONES FINALES

El compromiso de secuenciar el genoma humano completo para pricipios del 2000 estimuló el esfuerzo de secuenciación y favoreció el desarrollo de nuevos métodos para hacer más rápido el proceso. En 1996 se completó la secuenciación del genoma de levadura, que consta de unos 14×10^6 pb, distribuidos en 16 cromosomas. El genoma del nematodo **Caenorhabditis elegans** fue secuenciado en 1998. El genoma de *C. elegans* contiene unos 18 000 genes, en comparación con los 6000 de levadura. En el 2000, un equipo interdisciplinar de Celera Genomics en Rockville, Maryland, adoptó una nueva metodología para secuenciar los 180×10^6 pb

del genoma de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Emplearon una **estrategia de secuenciación simultánea** de todo el genoma, en oposición a la aproximación cromosoma a cromosoma usada en el Proyecto del Genoma Humano. En esencia, el método consiste en romper el genoma entero en pequeños fragmentos, secuenciar los fragmentos por procedimientos rápidos automatizados y ensamblar los fragmentos en el orden correcto usando las secuencias de solapamiento con la asistencia de un superordenador. La validez del método fue apoyada por secuencias clonadas anteriormente. La determinación de la secuencia genómica es sólo una parte del problema. Hay que determinar el inicio y el final de los genes, además de su función, proceso conocido por **anotación**. El logro de secuenciar y anotar el genoma de *Drosophila* por el grupo de Celera Genomics y colaboradores es todavía más impresionante si se tiene en cuenta que se completó en menos de un año. El grupo de Celera Genomics se planteó usar el metodo de secuenciación simultánea para acelerar la secuenciación del genoma humano. Varios cromosomas humanos ya se habían mapeado y miles de clones de cDNA se habían secuenciado o estaban a punto de serlo a principios del 2000, lo que proporcionaría en último término señales reconocibles del enorme mapa genético humano. Estos procedimientos dieron como resultado la secuenciación completa o casi completa de cinco cromosomas, los cromosomas 5, 16, 19, 21 y 22. El 26 de junio del 2000, el Presidente Bill Clinton en presencia de J. Craig Venter (Presidente de Celera Genomics) y Francis S. Collins (director del National Human Genome Research Institute) anunció que el 97% del genoma humano había sido secuenciado, con un gran adelanto sobre el plazo anunciado. Los genomas eucarióticos normalmente contienen regiones heterocromáticas permanentemente condensadas alrededor de los centrómeros. Estas regiones habitualmente contienen DNA repetitivo que no puede ser clonado o secuenciado con los métodos disponibles. Por lo tanto, ninguna secuencia eucariótica puede considerarse "completa". Puede que pasen décadas antes de que se consiga la determinación completa de los genes y de sus regiones reguladoras. La secuenciación del genoma humano es sólo el principio de nuestra investigación del funcionamiento de nuestra constitución genética. La **proteómica** (véase la p. 144), está dirigida a la identificación de las proteínas codificadas por los genomas recientemente secuenciados.

La identificación de todos los genes humanos y de sus secuencias reguladoras debería mejorar notablemente nuestra comprensión de las enfermedades genéticas. Estos conocimientos deberían contribuir a nuevos tratamientos para paliar o curar estas enfermedades. Se han iniciado centenares de pruebas clínicas en terapia génica que implican a muchos pacientes. Las enfermedades genéticas conocidas, y las que puedan descubrirse en el futuro, podrían curarse finalmente mediante terapias de reemplazamiento génico, una vez se hayan superado los obstáculos técnicos. El principal problema es el desarrollo de vectores seguros y eficientes que no induzcan una respuesta tóxica, como ocurrió con un joven paciente tratado de una deficiencia del enzima hepático ornitina transcarbamilasa. Considerando los enormes progresos de la biología molecular en las últimas tres décadas, es razonable creer que pronto se producirán avances significativos. En el pasado, el desafío que debían afrontar los científicos era cómo secuenciar el genoma humano; el nuevo desafío es cómo aprovechar estos conocimientos en beneficio de la humanidad.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, D. M., Celniker, S. E., Holt, R. A., y 192 colaboradores. The genome sequence of *Drosophila melanogaster. Science* 287:2185, 2000.

Brown, W. M., George, M. Jr. y Wilson, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1967, 1979.

Bushman, F. Targeting retroviral integration. *Science* 267:1443, 1995.

Capecchi, M. R. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288, 1989.

C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans:* a platform for investigating biology. *Science* 282:2012, 1998.

Battey, J. F., Davis, L. G. y Kuehl, W. M. *Basic Methods in Molecular Biology,* 2nd ed. New York: Appleton, 1994.

Erlich, H. A. (Ed.). *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification.* New York: Stockton Press, 1989.

Feinberg, A. y Vogelstein, B. Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137:266, 1984.

Fields, S. Proteomics; Proteomics in genomeland. *Science* 291:1221, 2001.

Goffeau, A., et al. Life with 6,000 genes. *Science* 274:546, 1996.

International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing of the human genome. *Nature* 409:860, 2001.

Jaenisch, R. Transgenic animals. *Science* 240:1468, 1988.

Kerr, L. D. Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol.* 254:619, 1995.

Kreeger, K.Y. Influential consortium's cDNA clones praised as genome research time-saver. *Scientist* 9:1, 1995.
Kunkel, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1985.
McPherson, M. J., Quirke, P. y Taylor, G. R. (Eds.). *PCR. A Practical Approach,* Vol. 1. Oxford, England: Oxford University Press, 1994.
Marshall, E. Gene therapy's growing pains. *Science* 269:1050, 1995.
Maxam, A. M. y Gilbert, W. A new method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560, 1977.
Mulligan, R. C. The basic science of gene therapy. *Science* 260:926, 1993.
Palmiter, R. D., et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611, 1982.
Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. y Berg, P. Labelled deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237, 1977.
Sambrook, J. y Russell, D. W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual,* 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463, 1977.
Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503, 1975.
Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., et al. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304, 2001.
Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R. y Feinberg, A. P. Use of restriction fragment length polymorphism to determine the clonal origin of human tumors. *Science* 227:642, 1985.
Watson, J. D., Tooze, J. y Kurtz, D. T. *Recombinant DNA: A Short Course.* San Francisco: Scientific American Books, Freeman, 1983.
Weintraub, H. M. Antisense RNA and DNA. *Sci. Am.* 262:40, 1990.
Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. y Campbell, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810, 1997.
Zhang, Y. y Yunis, J. J. Improved blood RNA extraction micro-technique for RT-PCR. *BioTechniques* 18:788, 1998.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. El desarrollo de las técnicas del DNA recombinante se basó en el descubrimiento de:
   A. la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
   B. las endonucleasas de restricción.
   C. los plásmidos.
   D. el DNA complementario (cDNA).
   E. los cromosomas artificiales de levadura (YAC).

2. En la construcción de un mapa de restricción se emplean todas las técnicas siguientes EXCEPTO:
   A. la hidrólisis parcial del DNA.
   B. la hidrólisis completa del DNA.
   C. la separación electroforética en gel de los fragmentos.
   D. la tinción de un gel de electroforesis para localizar el DNA.
   E. el calentamiento y enfriamiento cíclicos de la mezcla de reacción.

3. En el método de Maxam–Gilbert de secuenciación de DNA:
   A. el corte del esqueleto del DNA se produce al azar sólo en alguno de los sitios en los que se ha destruido la base.
   A. todos los nucleótidos producidos durante el corte del esqueleto del DNA se detectan por autorradiografía.
   A. la separación electroforética de fragmentos de DNA se debe a diferencias tanto en el tamaño como en la carga.
   A. la secuencia de bandas en los cuatro carriles de la autorradiografía contiene la información de la secuencia de bases.
   A. se utilizan didesoxinucleósidos trifosfato.

4. Los métodos de secuenciación de DNA de Sanger y de Maxam–Gilbert difieren en que:
   A. el método de Maxam–Gilbert requiere el marcaje del extremo 5′, mientras que el método de Sanger requiere el marcaje en cualquiera de los extremos del DNA.
   B. sólo el método de Maxam–Gilbert requiere la electroforesis de una mezcla de fragmentos de diferente tamaño.
   C. en el método de Sanger se corta el DNA, mientras que en el método de Maxam–Gilbert se interrumpe la síntesis de la cadena.
   D. sólo el método de Maxam–Gilbert utiliza la autorradiografía para detectar fragmentos en los que uno de los extremos está marcado radiactivamente.
   E. con el método de Sanger se puede secuenciar un segmento más largo de DNA que con el método de Maxam–Gilbert.

5. La preparación de DNA recombinante requiere:
   A. el corte escalonado de las moléculas de DNA por medio de las endonucleasas de restricción.
   B. el corte por medio de endonucleasas de restricción para generar fragmentos con los extremos romos.
   C. poli(dT).
   D. DNA ligasa.
   E. cDNA.

6. En la selección de colonias de bacterias que llevan DNA clonado en plásmidos tales como pBR322, que contienen dos genes de resistencia a antibiótico:
   A. un gen de resistencia a antibiótico no es funcional en las colonias bacterianas deseadas.
   B. las bacterias no transformadas son resistentes al antibiótico.
   C. las dos resistencias a antibiótico son funcionales en las colonias bacterianas deseadas.
   D. las sondas de DNA o RNA radiactivas juegan un papel.
   E. ninguna de las anteriores.

7. Una técnica que permite conocer el orden de los genes en fragmentos de DNA muy grandes (50–100 kb) es:
   A. RFLP.
   B. el paseo cromosómico.
   C. el desplazamiento de mella.
   D. la transferencia Southern.
   E. los SSCP.

Tener en cuenta lo siguiente para las preguntas 8-10:

   A. Ácido nucleico antisentido.
   B. PCR.
   C. Mutagénesis dirigida.
   D. Vector lanzadera.
   E. Transfección.

8. Contiene a la vez señales de replicación bacterianas y eucarióticas.
9. Complementario del mRNA e hibridará con él, bloqueando la traducción.
10. Se utiliza un oligómero desapareado como cebador.

Preguntas 11 y 12: En Estados Unidos, un de las principales causas de muerte durante el primer año es el síndrome de la muerte súbita (SIDS). Un estudio mostró una clara correlación entre un elevado riesgo de SIDS y un intérvalo QT largo en el ritmo cardíaco. En un niño, un gen

asociado al síndrome del QT largo presentaba una sustitución de AAC por TTC. Este gen codifica una proteína asociada con el canal de sodio. La mutación fue detectada por polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).

11. De las siguientes afirmaciones sobre los SSCP ¿cuáles son correctas?
    A. La movilidad electroforética en geles de poliacrilamida de pequeños fragmentos de cadena sencilla depende en parte de la conformación secundaria.
    B. Tiene que haber un sitio para una endonucleasa de restricción en la región estudiada por SSCP.
    C. En esta técnica no se usa el marcaje radiactivo.
    D. No hace falta conocer la secuencia del DNA estudiado.
    E. Todas las afirmaciones anteriores son correctas.

12. Para conseguir suficiente DNA para muchas técnicas, tales como los SSCP, el DNA es amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La propiedad esencial de la DNA polimerasa empleada en la PCR es que:
    A. no requiere cebador.
    B. Es sumamente activa.
    C. Es termoestable.
    D. Replica DNA de doble cadena.
    E. Puede replicar DNA tanto de origen procariótico como eucariótico.

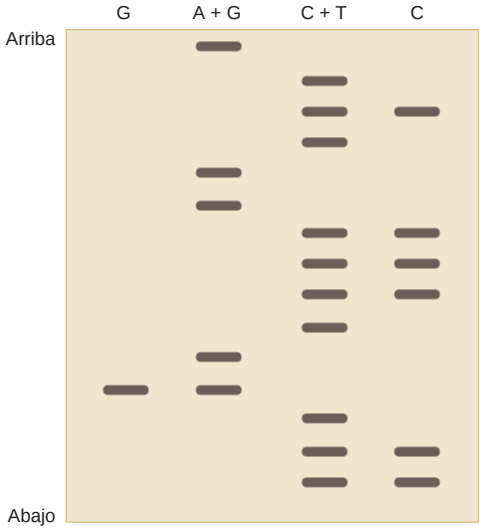
Preguntas 13 y 14: El objetivo de la terapia génica es introducir un gen normal en células que contengan un gen defectivo. La primera experiencia de terapia génica fue autorizada para tratar a una niña de cuatro años aquejada de una deficiencia de adenosina desaminasa (ADA). Los niños con ADA presentan una severa inmunodeficiencia combinada (SCID), y normalmente mueren durante los primeros años a causa de infecciones múltiples. Se construyó un retrovirus modificado que contenía el gen humano de la ADA, que podía expresarse en las células humanas, mientras que el virus no podía replicarse. Las células T aisladas de la niña fueron "infectadas" con el retrovirus para que incorporaran el gen de la ADA normal. La células T modificadas fueron reintroducidas en el paciente. La niña tiene ahora 13 años y se encuentra bien.

13. La expresión de genes recombinantes en células de mamífero:
    A. no se produce si el gen contiene un intrón.
    B. Ocurre más eficientemente si se usa cDNA en el vector.
    C. No requiere la inserción direccional del gen en el vector.
    D. Requiere que el vector tenga elementos potenciadores y promotores introducidos en el vector.
    E. No requiere que el vector tenga un origen de replicación (ori).

14. Otra aplicación clínica del DNA recombinante es la obtención de grandes cantidades de proteínas específicas en las bacterias (p. ej., hormonas). La expresión de un gen eucariótico en procariotas requiere:
    A. una secuencia Shine-Dalgarno (SD) en el mRNA.
    B. ausencia de intrones.
    C. elementos reguladores más arriba del gen.
    D. una proteína de fusión.
    E. todas las anteriores.

Problemas

15. Abajo se muestra la autorradiografía de una de las cadenas de un fragmento de DNA secuenciada por el método de Maxam y Gilbert. El extremo 5′ del nucleótido se marcó con ^{32}P. ¿Cuál es la secuencia del fragmento? Construya el patrón autorradiográfico de la secuencia complementaria.



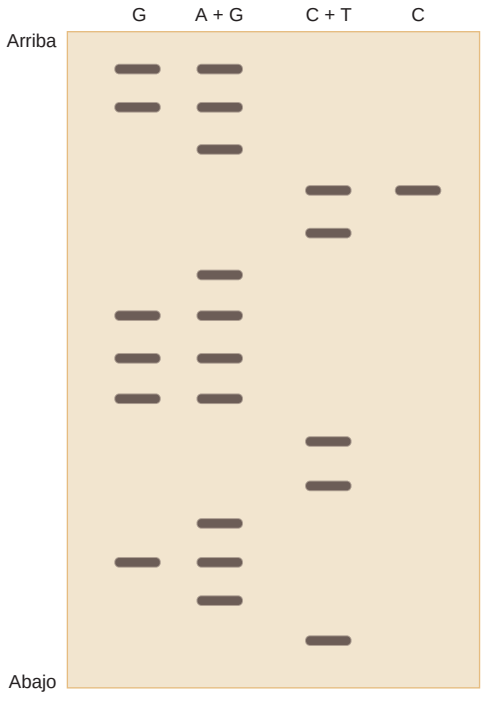
16. ¿Cuál sería el mejor vector para contener un fragmento de DNA de 250 kb? ¿Se podría usar algún otro vector? ¿Por qué?

RESPUESTAS

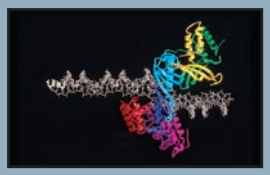
1. **B** La capacidad para cortar el DNA de manera predecible en sitios específicos es esencial en la tecnología del DNA recombinante. A, C, E. Estas técnicas o estructuras se emplean en la tecnología del DNA recombinante, pero se desarrollaron con posterioridad.
2. **E** El calentamiento y el enfriamiento cíclicos son parte del proceso de la PCR. La elaboración de mapas de restricción incorpora todos los grados de hidrólisis. La hidrólisis parcial da fragmentos de varios tamaños y la hidrólisis completa da los fragmentos más cortos posibles. C, D: Los fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa, que se tiñe para revelar el DNA.
3. **D** Las posiciones relativas de la G se obtienen de las bandas del carril correspondiente a la destrucción de las G; de la A por las bandas en el carril AG que no están duplicadas en el carril G; de la C por las bandas en el carril C; de la T por las bandas en el carril CT que no están duplicadas en el carril C. A: El corte se produce en todos los sitios modificados. La destrucción limitada de las bases es al azar. B: Sólo se detectan los nucleótidos que contienen el extremo 5′ marcado. Se generan otros nucleótidos, pero no se detectan con este método y no aportan información al análisis. C: Si bien se requiere, por supuesto, la carga para que se produzca el movimiento de una partícula en un campo eléctrico, la separación de estos fragmentos no se debe a diferencias de carga, sino a diferencias de tamaño, siendo los fragmentos más pequeños los que migran más rápido. E: Es un paso del método de Sanger.
4. **E** El método de Sanger puede secuenciar unas 400 bases, mientras que el de Maxam y Gilbert se limita a 250 bases. El método de Sanger exige un extremo 5′ marcado. En el método de Ma-

xam y Gilbert cualquiera de los dos extremos puede estar marcado. B: Es aplicable a ambos métodos. C: Esta afirmación invierte las metodologías. D: Ambas usan la autorradiografía para detectar fragmentos en los que uno de los extremos está marcado con radiactividad.

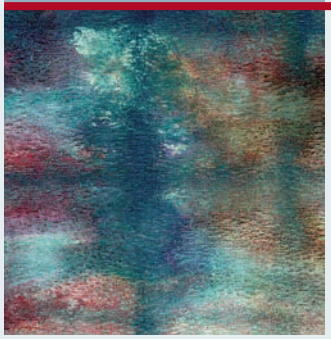
5. **D** La DNA ligasa une covalentemente dos fragmentos enlazándolos por sus extremos cohesivos. A: Este es el tipo de endonucleasa de restricción más conveniente, pero no es esencial. B: En caso que sea necesario también pueden utilizarse endonucleasas de restricción que realicen cortes con extremos romos. C: Se utilizan conjuntamente con poli(A) en el caso de emplear endonucleasas de restricción que corten dando lugar a extremos romos, aunque no es esencial en todas las preparaciones de DNA recombinante. E: El cDNA no es más que uno de los tipos que se pueden utilizar.
6. **A** El DNA foráneo se inserta en uno de los genes de resistencia a antibiótico y, por consiguiente, lo destruye. B: La resistencia se debe a los plásmidos. C: Véase el comentario de la respuesta A. D: El marcaje radiactivo detecta el DNA de interés, no las colonias que contienen DNA clonado.
7. **B** A: El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) es una característica del DNA, no una técnica. C: El desplazamiento de mella se usa para marcar el DNA para su uso en el paseo cromosómico. D: La transferencia Southern es un método para analizar el DNA. E: El polimorfismo en la conformación del DNA monohebra (SSCP) es un método que se utiliza para detectar cambios en las bases del DNA que no alteran dianas de enzimas de restricción.
8. **D** Permite clonar un gen y purificarlo en grandes cantidades en bacterias y después el mismo vector puede se expresado en una célula de mamífero.
9. **A** Esta tecnología es parte de una disciplina denominada genética inversa.
10. **C** Permite la evaluación del papel de un aminoácido específico en una proteína y también puede ser usado para crear o destruir un sitio de endonucleasa de restricción en lugares específicos del DNA.
11. **A** Una sola sustitución normalmente modifica la conformación suficientemente para afectar la movilidad detectada por SSCP. B: Los SSCP es el método más útil si no hay un sitio de endonucleasa de restricción. C: El DNA es amplificado por PCR en presencia de nucleótidos marcados. Hay que disponer de un método para la detección de las bandas. D: El SSCP requiere el conocimiento previo de la secuencia.
12. **C** La PCR requiere la alternacia de temperaturas bajas, a las cuales se produce la hibridación del DNA molde y los cebadores oligoméricos, y tamperaturas altas, a las cuales el DNA funde. La DNA polimerasa Taq, aislada de un organismo termofílico aislado de una fuente termal, es estable a altas temperaturas y hace innecesario añadir nueva polimerasa en cada ciclo.
13. **D** Los sistemas eucarióticos requieren elementos de control, que no son necesarios en los sistemas bacterianos. A: La expresión puede mejorar si un intrón está presente. B: el cDNA no posee los elementos de control necesarios. C: El gen debe insertarse con la orientación correcta en relación con los elementos de control. E: El vector debe replicarse, por lo tanto necesita la secuencia para la replicación.
14. **E** La secuencia SD es necesaria para que el ribosoma bacteriano reconozca al mRNA. B: Las bacterias carecen de la maquinaria para eliminar los intrones del mRNA. C: Se necesitan elementos reguladores apropiados para la transcripción del DNA. D: El producto de la reacción puede ser una proteína de fusión.
15. La secuencia es CCTGATCCCAATCTA leída de 5′ a 3′. La autorradiografía de la cadena complementaria sería esta:



16. Los YAC (cromosomas artificiales de levadura) serían el mejor vector, pues pueden aceptar entre 200 y 500 kb de DNA. Los cósmidos aceptan el tamaño inmediatamente inferior, pero es de sólo 45 kb. Los plásmidos y los bacteriófagos aceptan trozos mucho más cortos.



8



REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Daniel L. Weeks y
John E. Donelson

8.1 VISIÓN GENERAL 330

8.2 LA UNIDAD DE TRANSCRIPCIÓN EN LAS BACTERIAS: EL OPERÓN 330

8.3 EL OPERÓN LACTOSA DE *E. COLI* 332

El represor del operón lactosa es una proteína difusiva 333
En el DNA la secuencia del operador del operón lactosa se encuentra contigua al promotor y a tres genes estructurales 335
La secuencia del promotor del operón lactosa contiene sitios de reconocimiento de la RNA polimerasa y de una proteína reguladora 336
La proteína activadora de catabolito se une a un sitio del promotor lactosa 337

8.4 EL OPERÓN TRIPTÓFANO DE *E. COLI* 338

El operón triptófano está controlado por una proteína represora 338
El operón triptófano posee un segundo sitio de control: la región atenuadora 340
La atenuación de la transcripción constituye un mecanismo general de control en los operones para la biosíntesis de aminoácidos 341

8.5 OTROS OPERONES BACTERIANOS 343

La síntesis de proteínas ribosómicas se regula de manera coordinada 343
La respuesta estricta controla la síntesis de rRNA y tRNA 344

8.6 TRANSPOSONES BACTERIANOS 345

Los transposones son segmentos móviles de DNA 345
El transposón *Tn3* contiene tres genes estructurales 346

8.7 EXPRESIÓN GÉNICA EUCARIÓTICA 347

El DNA eucariótico se une a las histonas para formar la cromatina 347
La metilación del DNA está asociada con la inactivación génica 349

8.8 EL COMPLEJO DE PREINICIACIÓN EN LOS EUCARIOTAS: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, RNA POLIMERASA II Y DNA 350

El promotor y otras secuencias que influyen en la transcripción eucariótica 353
Diseño modular de los factores de transcripción eucarióticos 354
Motivos comunes en las proteínas que interaccionan con el DNA y regulan la transcripción 354

8.9 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EUCARIÓTICA 357

Regulación de los reguladores 358
La activación de la transcripción del gen del receptor de las LDL ilustra muchas de las características encontradas en la regulación génica eucariótica 359

BIBLIOGRAFÍA 361

PREGUNTAS 361

RESPUESTAS 362

APLICACIONES CLÍNICAS

8.1 Resistencia transmisible a múltiples fármacos 346
8.2 Síndrome de Rubinstein-Taybi 349
8.3 Unión del tamoxifeno a los receptores de los estrógenos 358
8.4 Factores de transcripción y enfermedades cardiovasculares 359

8.1 VISIÓN GENERAL

Para sobrevivir, una célula debe ser capaz de responder a los cambios del medio ambiente. Una de las maneras que tienen las células de adaptarse a estos cambios es mediante la alteración de la expresión de genes específicos, que, a su vez, afecta el número de moléculas de las proteínas correspondientes. Este capítulo se centrará en algunos de los mecanismos moleculares que determinan cuándo y en qué medida se expresa un gen determinado. El estudio de la regulación de la expresión génica constituye hoy en día una de las áreas más activas de la investigación bioquímica.

Una célula tiene que variar la cantidad de un determinado producto génico según las diferentes condiciones. Por ejemplo, la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) contiene genes que codifican aproximadamente 4300 proteínas diferentes, pero no necesita sintetizarlas todas al mismo tiempo. Por consiguiente, regula el número de moléculas que se sintetizan de estas proteínas. El ejemplo clásico de este fenómeno es la regulación del número de moléculas de **β-galactosidasa** en la célula. Este enzima convierte el disacárido lactosa en los monosacáridos glucosa y galactosa. Cuando *E. coli* crece en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono, no necesita β-galactosidasa, y solamente se encuentran presentes en la célula unas cinco moléculas de enzima. Sin embargo, cuando la única fuente de carbono es la lactosa, se hallan presentes en la célula 5000 o más moléculas de β-galactosidasa. Las bacterias responden claramente a la necesidad de metabolizar lactosa, aumentando la síntesis de moléculas de β-galactosidasa. Si se elimina la lactosa del medio, la síntesis de este enzima se detiene tan rápidamente como empezó.

La complejidad de las células eucarióticas comporta que posean mecanismos de regulación génica incluso más complejos que los de los procariotas. Las células diferenciadas de los organismos superiores tienen una estructura física mucho más complicada y a menudo también una función biológica más especializada, determinada igualmente por la expresión de sus genes. Por ejemplo, la **insulina** se sintetiza en las células β del páncreas y no en las células renales, a pesar de que los núcleos de todas las células del cuerpo contienen los genes de la insulina. Determinados mecanismos de regulación molecular facilitan la expresión de insulina en el páncreas y evitan su síntesis en el riñón y en otras células del cuerpo. Además, durante el desarrollo del organismo, la aparición o desaparición de proteínas en tipos celulares específicos se encuentra estrictamente controlada en cuanto a la duración y a la secuencia de los procesos del desarrollo.

Como es de esperar a partir de sus diferencias de complejidad, se conoce mucho más acerca de la regulación génica en procariotas que en eucariotas. Sin embargo, el estudio del control de la expresión génica en procariotas proporciona a menudo nuevas e interesantes ideas que pueden ponerse a prueba en sistemas eucarióticos. Y, por otra parte, los descubrimientos acerca de la estructura génica y la regulación eucariótica modifican algunas veces la interpretación de los datos obtenidos en el estudio del control de genes procarióticos.

En este capítulo se abordarán algunos de los ejemplos mejor estudiados de regulación génica en bacterias, seguidos de algunos ejemplos de los muchos factores de transcripción que regulan la expresión de los genes en el genoma humano.

8.2 LA UNIDAD DE TRANSCRIPCIÓN EN LAS BACTERIAS: EL OPERÓN

El cromosoma de *E. coli* consiste en una única molécula de DNA circular de doble cadena de 4,6 millones de pares de bases, cuya secuencia ha sido determinada por completo. La mayoría de los aproximadamente 4300 genes de *E. coli* no se distribuyen al azar a lo largo de este DNA, sino que los genes que codifican los enzimas de una ruta metabólica específica están agrupados en una región del DNA. Además, los genes correspondientes a proteínas estructurales asociadas, como las aproximadamente 70 proteínas que forman el **ribosoma**, suelen estar en posiciones adyacentes. Los componentes de una serie de genes agrupados suelen estar regulados de manera coordinada; se transcriben juntos, formando un **mRNA** "**policistrónico**", que contiene las secuencias codificadoras de varias proteínas. El término **operón** se utiliza para describir la unidad reguladora completa de una serie de genes agrupa-

dos. Un operón incluye los **genes estructurales** adyacentes que codifican los enzimas relacionados con ellos o proteínas asociadas, uno o varios **genes reguladores** que codifican una o varias proteínas reguladoras, y los **elementos de control**, que son sitios del DNA ubicados cerca de los genes estructurales, y sobre los que actúan las proteínas reguladoras. La Figura 8.1 muestra un mapa genético parcial del genoma de *E. coli*, que indica la localización de los genes estructurales de algunos de los muchos operones de *E. coli*.

Cuando la transcripción de los genes estructurales de un operón aumenta en respuesta a la presencia de un sustrato específico en el medio, el efecto observado se conoce como **inducción**. El aumento en la transcripción del gen de la β-galactosidasa cuando la lactosa constituye la única fuente de carbono es un ejemplo de inducción. Las bacterias pueden responder también a cambios nutricionales desactivando rápidamente la síntesis de enzimas que ya no son necesarios. Como se describirá más adelante, *E. coli* sintetiza el aminoácido triptófano como producto final de una ruta biosintética específica. Sin embargo, si se añade triptófano al medio de cultivo, la bacteria ya no necesita fabricarlo, y se detiene la síntesis de los enzimas

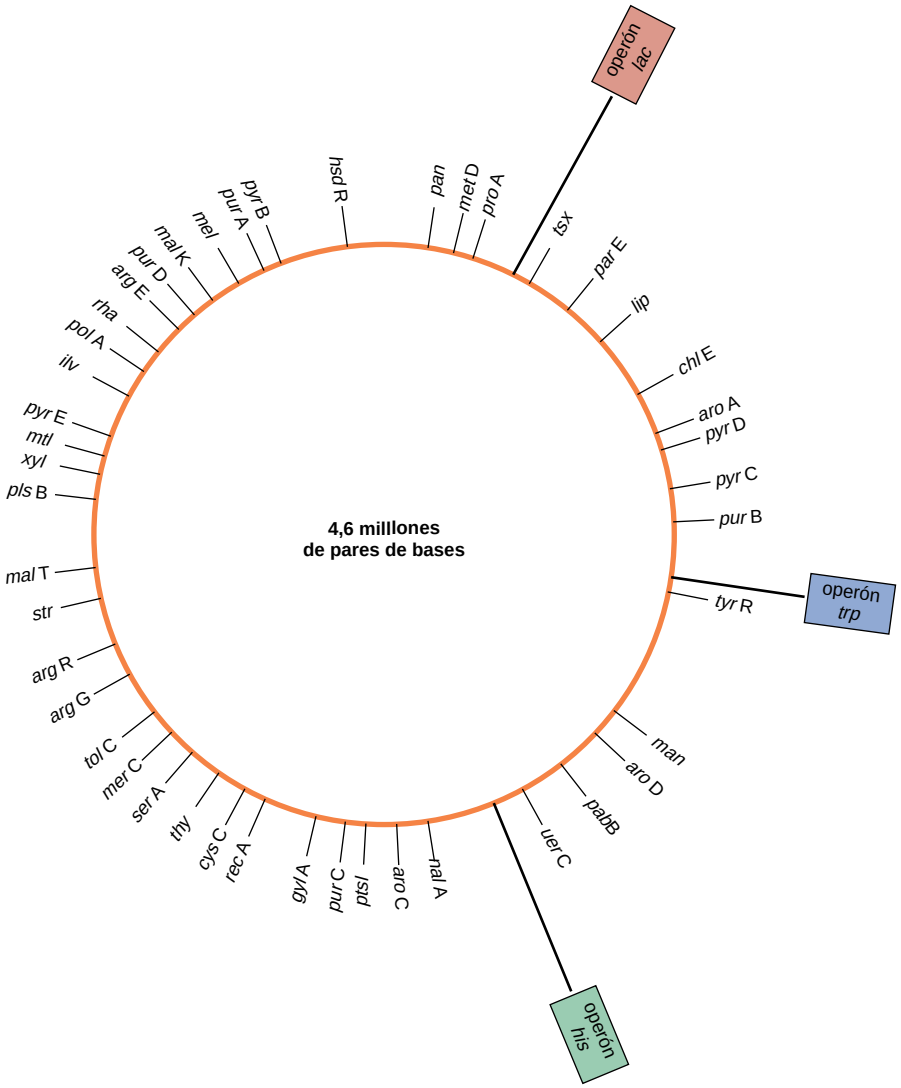


FIGURA 8.1
Mapa genético parcial de *E. coli*.
Se muestran la localización de unos pocos de los 4300 genes del genoma circular de *E. coli*. Se indican los tres operones estudiados en este capítulo.
Reproducido con permiso de Stent, G. S. y Calendar, R. Molecular Genetics, An Introductory Narrative. *San Francisco: Freeman, 1978, p. 289; modified from Bachmann, B. J., Low, K. B. y Taylor, A. L.* Bacteriol. Rev. *40:116, 1976.*

necesarios para esta ruta metabólica. Este efecto se denomina **represión**. Permite que las bacterias no desperdicien energía en la síntesis de proteínas innecesarias y a veces incluso dañinas.

La inducción y la represión son manifestaciones del mismo fenómeno. En un caso, la bacteria cambia su composición enzimática para poder utilizar un sustrato específico del medio; en el otro caso, reduce el número de moléculas de enzima para no producir una cantidad excesiva de un determinado producto metabólico. La señal para ambos tipos de regulación es la pequeña molécula sustrato de la ruta metabólica o un producto de la misma, respectivamente. Estas pequeñas moléculas se denominan **inductores** cuando estimulan la inducción, y **correpresores** cuando causan la represión.

En la Sección 8.3 se describirá el operón lactosa en detalle, el ejemplo más estudiado del grupo de genes inducibles. En la Sección 8.4 se describirá el operón triptófano, un ejemplo de operón reprimible. En las Secciones 8.5 y 8.6 se describirán brevemente otros operones y algunos sistemas génicos en los que el movimiento físico de los propios genes dentro del DNA (es decir, los reordenamientos génicos) juegan un papel importante en su regulación.

8.3 EL OPERÓN LACTOSA DE *E. COLI*

El **operón lactosa** contiene tres genes estructurales adyacentes, como se muestra en la Figura 8.2. *Lac*Z codifica el enzima β-galactosidasa, compuesto por cuatro subunidades idénticas de 1021 aminoácidos. *Lac*Y codifica una permeasa, una proteína de 275 aminoácidos, localizada en la membrana celular, que participa en el transporte de azúcares, incluida la lactosa, a través de la membrana. El tercer gen, *lac*A, codifica la β-galactósido transacetilasa, un enzima de 275 aminoácidos que transfiere un grupo acetilo desde el acetil-CoA a los β-galactósidos. De estas tres proteínas, sólo la β-galactosidasa forma parte de una ruta metabólica conocida. Sin embargo, la permeasa tiene una importancia evidente, puesto que está implicada en el transporte de la lactosa hacia el interior de la célula. La reacción de acetilación podría estar asociada con reacciones de destoxificación y excreción de análogos de los β-galactósidos no metabolizados.

Las mutaciones en *lac*Z o en *lac*Y, que destruyen la función de la β-galactosidasa o de la permeasa, impiden que las células degraden lactosa o la adquieran del medio, respectivamente. Las mutaciones en *lac*A que destruyen la actividad transacetilasa parecen no tener un efecto discernible sobre el crecimiento y la división celulares. Es posible que haya en la célula otros enzimas relacionados que puedan sustituir la actividad de este enzima o, tal vez, éste tenga una función específica desconocida, necesaria sólo en determinadas condiciones.

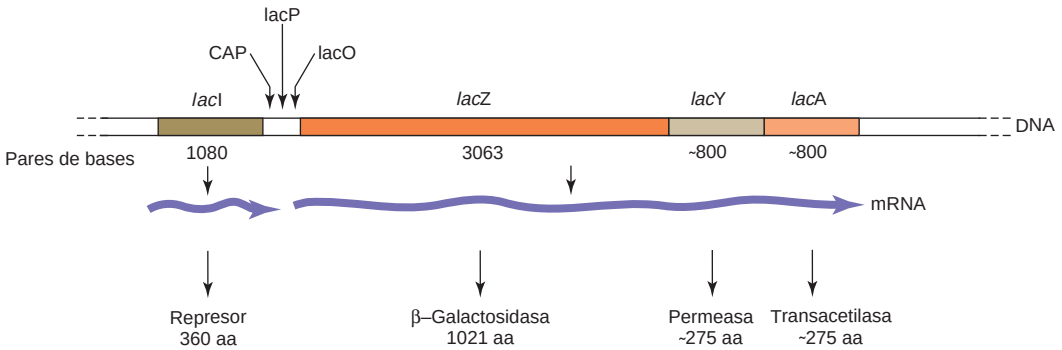


FIGURA 8.2
El operón lactosa de *E. coli*.
El operón lactosa se compone del gen *lac*I, que codifica el represor, los elementos de control de CAP, *lac*P y *lac*O y los tres genes estructurales *lac*Z, *lac*Y y *lac*A, los cuales codifican, respectivamente, la β-galactosidasa, una permeasa y una transacetilasa. El gen *lac*I se transcribe desde su propio promotor. Los tres genes estructurales se transcriben a partir del promotor *lac*P para formar un mRNA policistrónico a partir del cual se traducen las tres proteínas.

Una única especie de mRNA que contiene las secuencias codificadoras de los tres genes estructurales se transcribe a partir de un **promotor,** llamado *lac*P, situado justo antes del gen *lac*Z. La inducción de estos tres genes se produce durante la iniciación de su transcripción. Sin el inductor, la transcripción del grupo de genes se produce a un nivel muy bajo. En presencia del inductor, la transcripción empieza en *lac*P y continúa a lo largo de los tres genes hasta llegar a un terminador de la transcripción situado ligeramente más allá del final de *lac*A. Por lo tanto, los tres genes se **expresan coordinadamente**, es decir, o se transcriben al unísono o ninguno se transcribe.

La presencia de tres secuencias codificadoras en la misma molécula de mRNA implica que las cantidades relativas de las tres proteínas serán siempre las mismas en condiciones diferentes de inducción. Un inductor que provoque un elevado índice de transcripción inducirá un alto nivel de las tres proteínas; un inductor que solamente estimule ligeramente la transcripción del operón dará como resultado un bajo nivel de proteínas. Puede considerarse que el inductor es un interruptor molecular que afecta a la síntesis de la especie de mRNA única para los tres genes. Sin embargo, el número de moléculas de cada proteína en la célula puede ser diferente, pero ello no refleja diferencias en la transcripción, es el reflejo de diferencias en las velocidades de traducción de las secuencias codificadoras o en la degradación de las propias proteínas.

El mRNA inducido por la lactosa es muy inestable; su vida media es de aproximadamente 3 min. Por lo tanto, la expresión del operón puede modificarse muy rápidamente. La transcripción se detiene tan pronto como el inductor deja de estar presente, el mRNA existente desaparece en pocos minutos y la célula deja de fabricar las proteínas.

El represor del operón lactosa es una proteína difusiva

El gen regulador del operón lactosa, *lac*I, codifica una proteína cuya única función es el control de la iniciación de la transcripción de los tres genes estructurales *lac*. Esta proteína reguladora se denomina **represor** *lac*. El gen *lac*I se localiza justo delante de los elementos de control del grupo de genes *lac*ZYA. Sin embargo, no es obligatorio que un gen regulador se encuentre cercano físicamente del grupo de genes que regula. En otros operones no lo está. La transcripción de *lac*I no está sometida a regulación; este gen se transcribe siempre a partir de su propio promotor a una velocidad baja, que es relativamente independiente del estado de la célula. En consecuencia, la afinidad del promotor *lac*I por la **RNA polimerasa** es, al parecer, el único factor implicado en la iniciación de su transcripción.

El represor lactosa se sintetiza inicialmente en forma de monómeros de 360 aminoácidos, que se asocian para formar un homotetrámero, la forma activa del represor. Normalmente hay unos 10 tetrámeros por célula. El represor posee una fuerte afinidad por una secuencia específica de DNA que se encuentra entre *lac*P y el inicio de *lac*Z. Esta secuencia se denomina **operador**, y se designa *lac*O. El operador se solapa parcialmente con el promotor, de manera que la presencia del represor unido al operador impide físicamente que la RNA polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción.

Además de reconocer y unirse a la secuencia *lac*O, el represor tiene una gran afinidad por las moléculas inductoras del operón lactosa. Cada monómero posee un centro de fijación de una molécula inductora. La unión de inductor a los monómeros provoca un **cambio conformacional** en el represor que disminuye en gran medida su afinidad por la secuencia del operador (Figura 8.3). En consecuencia, el represor ya no se une al operador, y así la RNA polimerasa puede empezar la transcripción a partir del promotor. El inductor es capaz de interaccionar con el represor aunque éste se encuentre unido al operador, de forma que el complejo represor–inductor se disocia inmediatamente del operador.

El estudio del operón lactosa se ha visto facilitado en gran medida por el descubrimiento de pequeñas moléculas que sirven fortuitamente de inductores, pero que no son metabolizadas por la β-galactosidasa. El isopropiltiogalactósido (**IPTG**) es uno de los diversos tiogalactósidos que poseen esta propiedad. Estos compuestos se denominan **inductores gratuitos**. Se unen a los sitios de fijación del inductor de la molécula de represor, causando el cambio conformacional, pero no son cortados por acción de la β-galactosidasa inducida. Por lo tanto, afectan al sistema sin que ellos mismos sean alterados (metabolizados) por éste. Si no hubiera sido posible

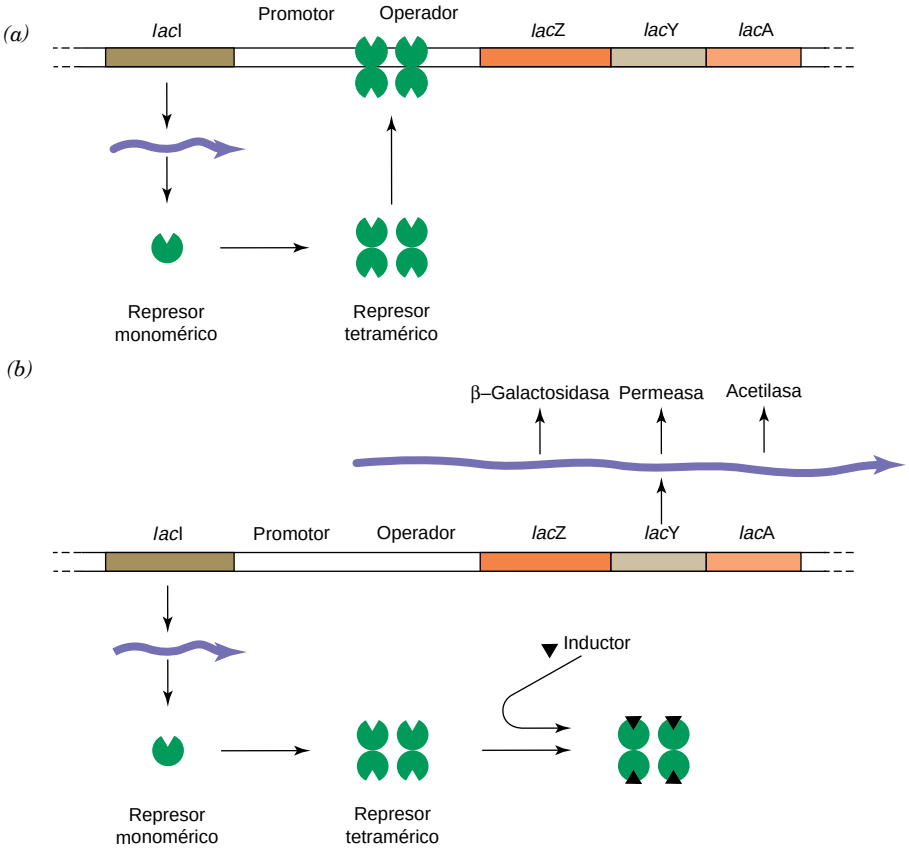


FIGURA 8.3
Control del operón *lac*.
(*a*) El tetrámero del represor se une al operador y evita la transcripción de los genes estructurales.
(*b*) El inductor se une al tetrámero del represor, lo que impide que el represor se una al operador. La transcripción de los tres genes estructurales puede darse a partir del promotor.

manipular experimentalmente el sistema con estos inductores gratuitos, habría sido mucho más difícil alcanzar el grado actual de conocimiento del operón lactosa en particular y de la regulación génica bacteriana en general.

El producto del gen *lac*I, la proteína represora, actúa en trans, es decir, es un producto difusivo que se desplaza a través de la célula hasta su sitio de acción. Por ello, las mutaciones en el gen *lac*I pueden ejercer efectos sobre la expresión de otros genes alejados. Las mutaciones en *lac*I pueden ser de varios tipos. En uno de ellos, se producen cambios o deleciones de aminoácidos del represor que se hallan situados en el sitio de fijación del inductor. Estos cambios interfieren en la interacción entre el inductor y el represor, pero no afectan a la afinidad de éste por el operador. Por lo tanto, el represor permanece siempre unido al operador, incluso en presencia del inductor, y los genes *lac*ZYA nunca son transcritos por encima de un nivel basal muy bajo. En otro tipo de mutaciones se producen cambios en los aminoácidos situados en el sitio de fijación del represor al operador. La mayoría de estas mutaciones disminuyen la afinidad del represor por el operador. Ello implica que el represor no se une al operador y los genes *lac*ZYA son transcritos continuamente. Estas mutaciones se denominan **constitutivas del represor** porque en ellas los genes *lac* se encuentran permanentemente activados. Es interesante señalar que unos pocos mutantes *lac*I incrementan la afinidad del represor por el operador por encima de la afinidad observada para el represor del tipo salvaje. En estos casos, las moléculas de inductor pueden unirse al represor, pero son menos efectivas para producir la liberación del represor del operador.

Los mutantes constitutivos del represor aclaran las características de un sistema de control negativo. En ausencia de un inductor, un represor activo bloquea la

expresión de los genes estructurales *lac*. Un represor inactivo da como resultado una expresión constitutiva, no regulada, de los genes. Utilizando las técnicas del DNA recombinante descritas en el Capítulo 7, es posible introducir en células mutantes *lac*I constitutivas un plásmido recombinante que contenga el gen *lac*I de tipo salvaje (pero no el resto del operón *lac*). Estas células contendrán, por lo tanto, un gen *lac*I del tipo mutante y otro del tipo salvaje, y sintetizarán tanto moléculas de represor activas como inactivas. En estas condiciones se observa la regulación normal de tipo salvaje del operón lactosa. En términos genéticos, la inducción de tipo salvaje es dominante sobre el carácter mutante. Esta es la propiedad más importante de un sistema de control negativo.

En el DNA la secuencia del operador del operón lactosa se encuentra contigua al promotor y a tres genes estructurales

Los elementos de control del lado 5′ de los genes estructurales del operón lactosa son el operador y el promotor. Originalmente, al igual que el gen *lac*I, el operador se identificó mediante mutaciones que afectaban la transcripción de la región *lac*ZYA. Algunas de estas mutaciones dan también como resultado la síntesis constitutiva del mRNA *lac*; es decir, son **mutaciones constitutivas del operador**. En estos casos, la secuencia de DNA del operador ha sufrido uno o más cambios de pares de bases que hacen que el represor no se una tan fuertemente a la secuencia. Como consecuencia, el represor resulta menos efectivo a la hora de impedir el inicio de la transcripción a cargo de la RNA polimerasa.

A diferencia de las mutaciones en el gen *lac*I que afectan al represor difundible, las mutaciones en el operador no tienen efecto sobre ningún producto difusivo. Ejercen su influencia sobre la transcripción en tan sólo los tres genes *lac* situados inmediatamente más abajo del operador en la misma molécula de DNA. Por lo tanto, si se introduce un segundo operón lactosa en una bacteria mediante un plásmido recombinante, el operador de uno de los operones no tiene influencia sobre la actuación del otro. En consecuencia, un operón con un operador del tipo salvaje será reprimido en las condiciones usuales, mientras que el segundo operón de la misma bacteria, que presenta una mutación constitutiva del operador, se transcribirá continuamente.

Las mutaciones en el operador se denominan frecuentemente **cis-dominantes**, para resaltar el hecho de que estas mutaciones solamente afectan a genes adyacentes contenidos en la misma molécula de DNA, y de que no son influidas por la presencia de otras copias de la misma secuencia no mutada. Las mutaciones cis-dominantes se producen en secuencias de DNA reconocidas por proteínas, en lugar de en secuencias codificadoras de proteínas difusivas. Las mutaciones **trans-dominantes** se producen en genes que codifican los proteínas difundibles. Por lo tanto, las mutaciones cis-dominantes también se dan en las secuencias promotoras y de finalización de la transcripción, mientras que las mutaciones trans-dominantes se observan también en los genes de las subunidades de la RNA polimerasa, las proteínas de los ribosomas, etc.

En la Figura 8.4 se muestran las secuencias del operador y del promotor *lac*. La secuencia del operador tiene un eje de **simetría binaria**. La secuencia de la hebra superior del lado izquierdo del operador es prácticamente igual a la de la hebra infe-

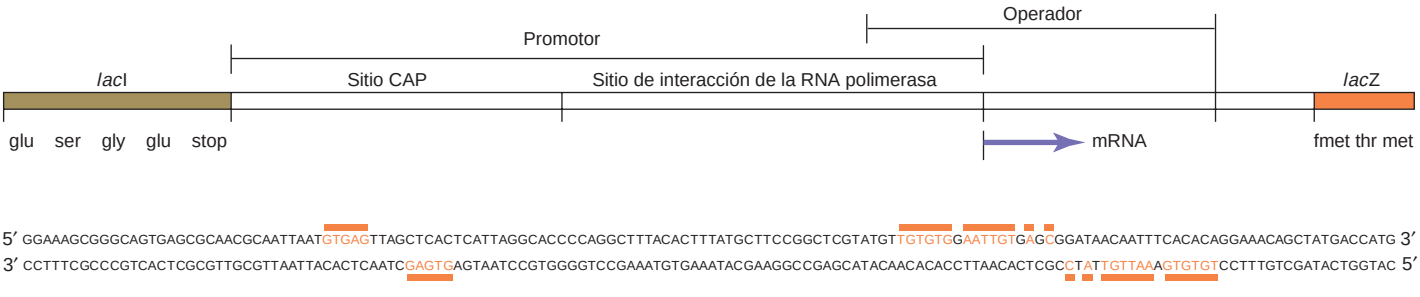


FIGURA 8.4
Secuencia nucleotídica de los elementos de control del operón lactosa.
También se muestran el extremo del gen *lac*I (que codifica el represor lactosa) y el principio del gen *lac*Z (que codifica la β-galactosidasa). Las líneas situadas por encima y por debajo de la secuencia indican secuencias simétricas en el sitio CAP y en el operador.

rior en su lado derecho; entre estas repeticiones invertidas de DNA se dan solamente tres diferencias. Esta simetría en la secuencia de reconocimiento del DNA refleja la simetría del represor tetramérico y facilita la existencia de una fuerte unión de las subunidades del represor al operador. La simetría binaria en la secuencia de nucleótidos es una característica común de muchos sitios de unión de proteínas al DNA de doble hebra, entre los cuales la mayoría de los sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción.

Los 30 pares de bases que constituyen el operador *lac* son una fracción extremadamente pequeña del total de 4,6 millones de pares de bases del genoma de *E. coli*, y ocupan una fracción incluso menor del volumen celular total. Todo parece indicar, por tanto, que los aproximadamente 10 represores tetraméricos de una célula deberían tener problemas para encontrar al operador *lac* si difundiesen al azar por la célula. Sin embargo, al menos dos factores confinan al represor en un espacio mucho menor que el volumen celular total. En primer lugar, el gen del represor se encuentra muy cerca del operador *lac*. Esto significa que el represor no debe desplazarse lejos por difusión si su traducción empieza antes de que se haya sintetizado completamente su mRNA. En segundo lugar, y aún más importante, el represor posee una afinidad general baja para todas las secuencias de DNA. Cuando el inductor se une al represor, su afinidad por el operador desciende en un factor de 1000 aproximadamente, sin que se altere la baja afinidad por las restantes secuencias de DNA. Por ello, todos los represores lactosa de la célula probablemente pasan la mayor parte del tiempo asociados débilmente con el DNA. Cuando la unión del inductor libera una molécula de represor de su unión con el operador, el represor se reasocia rápidamente con otra región cercana del DNA. Por ello, la inducción produce más bien una redistribución del represor sobre el DNA, que no genera moléculas de represor capaces de difundir libremente. Esto da como resultado el confinamiento del represor en un volumen menor en el interior de la célula.

¿Cómo puede entrar la lactosa en una célula reprimida si el producto del gen *lac*Y, la permeasa, se encuentra reprimida a pesar de que es necesaria para el transporte de lactosa a través de la membrana? La respuesta es que, incluso en el estado de máxima represión, existe un nivel basal muy bajo de transcripción del operón *lac*, que permite la existencia de cinco o seis moléculas de permeasa por célula. Probablemente sean suficientes para que un pequeño número de moléculas de lactosa entren en la célula e inicien el proceso.

Una observación aún más sorprendente es que, de hecho, la lactosa no es, como sería de esperar, el inductor natural del operón lactosa. Cuando se aísla el represor a partir de células completamente inducidas, la pequeña molécula unida a cada monómero de represor no es lactosa sino **alolactosa**.

La alolactosa, al igual que la lactosa, está compuesta por glucosa y galactosa, pero el enlace entre los dos azúcares es diferente. Sucede que una reacción secundaria de la β-galactosidasa (que normalmente actúa hidrolizando lactosa en glucosa y galactosa) convierte estos dos productos en alolactosa. La β-galactosidasa convierte unas pocas moléculas de lactosa en alolactosa, que posteriormente se unen al represor y provocan la inducción del operón. La confirmación de que la lactosa no es el auténtico inductor proviene de experimentos que indican que la unión de lactosa al represor purificado incrementa ligeramente la afinidad del represor por el operador. Por lo tanto, es necesario que una pequeña cantidad de alolactosa se halle presente en la célula en el estado inducido para poder superar este efecto "anti-inductor" de la lactosa.

La secuencia del promotor del operón lactosa contiene sitios de reconocimiento de la RNA polimerasa y de una proteína reguladora

La secuencia del promotor se encuentra inmediatamente delante de la secuencia del operador *lac*. Esta secuencia contiene los sitios de reconocimiento de la RNA polimerasa y de la **proteína activadora del catabolito** (**CAP**; también llamada **proteína receptora del cAMP** o **CRP**) (Figura 8.4). El sitio en que la RNA polimerasa se une al DNA para iniciar la transcripción se ha identificado utilizando métodos genéticos y bioquímicos. Las mutaciones puntuales en esta región suelen afectar frecuentemente a la afinidad con la que la RNA polimerasa se une al DNA. Las deleciones (o inserciones) en esta región también afectan drásticamente a la unión de la RNA polimerasa al DNA. Los extremos de la secuencia a los que se une la RNA polimerasa fueron identificados mediante experimentos de protección frente a la DNasa.

Se unió RNA polimerasa purificada a la región del promotor *lac*, clonada en el DNA de un bacteriófago o en un plásmido, y este complejo DNA–proteína se digirió con DNasa I. Se recuperó el fragmento de DNA protegido de la degradación y se determinó su secuencia. Los extremos del segmento protegido variaron ligeramente entre diferentes moléculas de DNA, pero se correspondían muy bien con los límites del sitio de interacción de la RNA polimerasa mostrados en la Figura 8.4.

La secuencia del sitio de interacción de la RNA polimerasa no está compuesta por elementos simétricos similares a los descritos para la secuencia del operador. Esto no es sorprendente, ya que la RNA polimerasa debe asociarse con el DNA de forma asimétrica para que pueda iniciarse la síntesis de RNA en una sola dirección a partir del sitio de unión. Sin embargo, la porción de la secuencia del promotor reconocida por CAP sí posee cierta simetría. Una **interacción proteína–DNA** en esta región potencia la transcripción del operón lactosa, tal como se describe en la sección siguiente.

La proteína activadora del catabolito se une a un sitio del promotor lactosa

Escherichia coli prefiere utilizar como fuente de carbono glucosa antes que otros azúcares. Por ejemplo, si la concentración de glucosa y lactosa en el medio es la misma, la bacteria metabolizará selectivamente glucosa y no utilizará lactosa. Ese fenómeno se ilustra en la Figura 8.5, donde se muestra que la aparición de β-galactosidasa, el producto de *lac*Z, se retrasa hasta que se gasta toda la glucosa del medio. Sólo entonces se puede utilizar la lactosa como fuente de carbono. Este retraso indica que la glucosa interfiere en la inducción del operón lactosa. Este efecto se denomina **represión por catabolito**, pues ocurre durante el catabolismo de la glucosa. Un efecto idéntico se observa sobre otros operones inducibles, incluidos los de la arabinosa y la galactosa, que codifican enzimas implicados en la utilización de otros azúcares como fuentes de energía. Probablemente se trate de un sistema de coordinación general para bloquear la síntesis de enzimas no deseados, siempre que se encuentre presente en el medio el sustrato preferido, la glucosa.

La represión por catabolito ocurre cuando la glucosa desactiva a la adenilil ciclasa y hace descender la concentración de **AMP cíclico** (**cAMP**) intracelular. El cAMP se une a la **proteína activadora del catabolito** (**CAP**), una proteína alostérica que, combinada con el cAMP, es capaz de unirse al sitio regulador CAP del promotor lactosa y de otros operones (Figura 8.6). El complejo CAP–cAMP ejerce un control

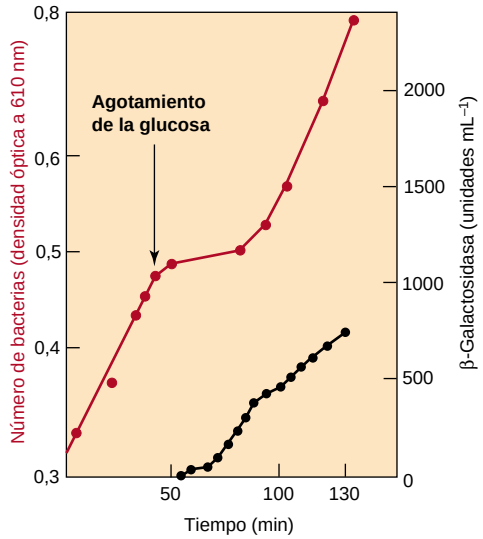


FIGURA 8.5
Ausencia de síntesis de β-galactosidasa en *E. coli* en presencia de glucosa.
Las bacterias crecieron en un medio que contenía inicialmente 0,4 mg mL^{-1} de glucosa y 2 mg mL^{-1} de lactosa. La ordenada de la izquierda indica la densidad óptica del cultivo en crecimiento, que es un indicador del número de células bacterianas. La ordenada de la derecha indica las unidades de β-galactosidasa por mililitro. Obsérvese que la aparición de β-galactosidasa se retrasa hasta que se ha agotado la glucosa.
Adaptado de Epstein, W., Naono, S. y Gros, F. Biochem. Biophys. Res. Commun. *24:588, 1966.*

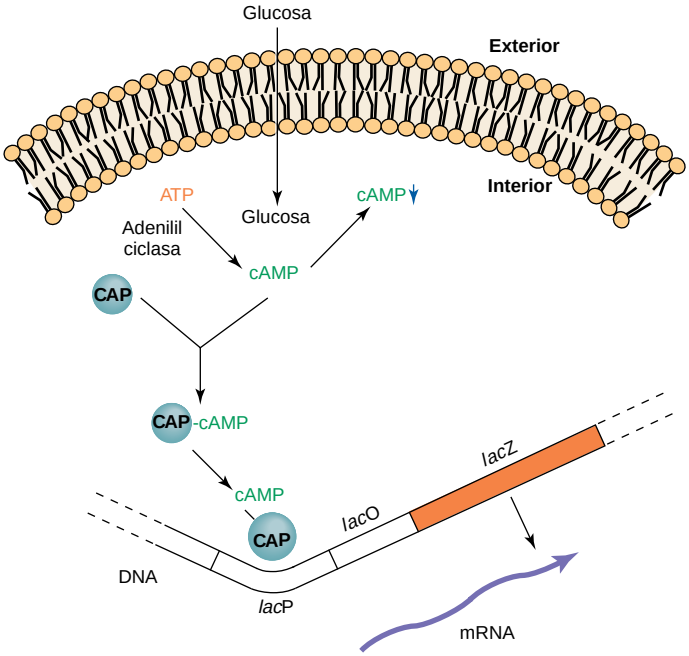


FIGURA 8.6
Control de *lac*P por cAMP.
Un complejo CAP–cAMP se une al sitio de CAP y activa la transcripción en *lac*P. La represión por catabolito se produce cuando la glucosa hace descender la concentración intracelular de cAMP lo que reduce la cantidad de complejo CAP–cAMP y disminuye la tasa de transcripción a partir de *lac*P y de los promotores de algunos otros operones.

positivo sobre la transcripción de estos operones. Su unión al sitio CAP de la doble hélice del DNA induce una curva cerrada en el DNA de unos 90º en el lugar de la unión. Esta curva del DNA y la interacción entre el complejo CAP-cAMP y la RNA polimerasa de *E. coli* activan la iniciación de la transcripción en el promotor. En cambio, si el sitio CAP no está ocupado, la RNA polimerasa se une con más dificultad al promotor y la transcripción del operón es mucho menos eficiente. Por lo tanto, cuando la glucosa se halla presente en el medio, el nivel de cAMP desciende, no se forma el complejo CAP–cAMP y no se da la influencia positiva sobre la RNA polimerasa. Por el contrario, en ausencia de glucosa, el nivel de cAMP es elevado, el complejo CAP–cAMP se une al sitio CAP y se potencia la transcripción.

Por lo tanto el operón lactosa muestra cómo las bacterias pueden coordinar una respuesta general (la necesidad de utilizar un azúcar como fuente de energía y de carbono) y una respuesta específica (la necesidad de utilizar lactosa como azúcar) a una determinada situación metabólica. Otros operones de *E. coli* ilustran cómo las bacterias responden frente a otras situaciones metabólicas.

8.4 | EL OPERÓN TRIPTÓFANO DE *E. COLI*

Las bacterias deben sintetizar cantidades adecuadas y equilibradas de los 20 aminoácidos que constituyen las proteínas. Por lo tanto las células deben ser capaces de detectar la disponibilidad de un determinado aminoácido y si su concentración intracelular es suficiente. El **triptófano**, por ejemplo, es necesario para la síntesis de todas las proteínas que lo contienen. Por lo tanto, si el triptófano no está presente en cantidades suficientes en el medio, la célula bacteriana debe producirlo. Por el contrario, la lactosa no es absolutamente necesaria para el crecimiento celular; muchos azúcares pueden sustituirla y, de hecho, tal como ya vimos en la sección precedente, la bacteria prefiere utilizar algunos de estos otros azúcares como fuente de carbono. En consecuencia, la síntesis de los enzimas de la biosíntesis del triptófano tiene una regulación diferente de la de las proteínas codificadas por el operón lactosa.

El operón triptófano está controlado por una proteína represora

En *E. coli*, el triptófano se sintetiza a partir del ácido corísmico en una ruta de cinco pasos catalizada por tres enzimas diferentes, tal como se muestra en la Figura 8.7. El **operón triptófano** contiene los cinco genes estructurales que codifican estos tres enzimas (dos de los cuales poseen dos subunidades diferentes). Más arriba de esta agrupación de genes se encuentra el promotor en el que empieza la transcripción y un operador al que se une la proteína represora codificada por el gen *trp*R, separado de los demás. La transcripción del operón lactosa está generalmente "desconectada", a no ser que sea inducida por una pequeña molécula inductora. Por su parte, el operón triptófano está siempre "conectado", a no ser que se encuentre reprimido por una pequeña molécula **correpresora** (término empleado para distinguirla de la proteína represora). Por tanto, el operón *lac* es inducible, mientras que el operón *trp* es reprimible. Cuando se transcribe activamente el operón *trp* se dice de él que está **desreprimido**; es decir, que el represor *trp* no impide la unión de la RNA polimerasa. Mecanísticamente, esto es equivalente a un operón lactosa inducido, en el que el represor *lac* no interfiere con la RNA polimerasa.

La ruta biosintética para la síntesis del triptófano está regulada por mecanismos que afectan tanto a la síntesis como a la actividad de los enzimas que catalizan la ruta. Por ejemplo, la antranilato sintetasa, que cataliza el primero de los pasos, está codificada por los genes *trp*E y *trp*D del operón triptófano. El número de moléculas de este enzima presentes en la célula está determinado por la regulación transcripcional del operón triptófano. Sin embargo, la actividad del enzima está regulada por **retroinhibición**. Esta es una manera común de regulación a corto plazo del primer paso determinante en una ruta metabólica. En este caso, el triptófano, producto final de la ruta metabólica, puede unirse a un centro alostérico de la antranilato sintetasa e interferir con su actividad catalítica en otro sitio de la molécula. Por tanto, al aumentar la concentración de triptófano en el medio celular, éste se une a la antranilato sintetasa, y disminuye inmediatamente su actividad sobre el sustrato, el ácido

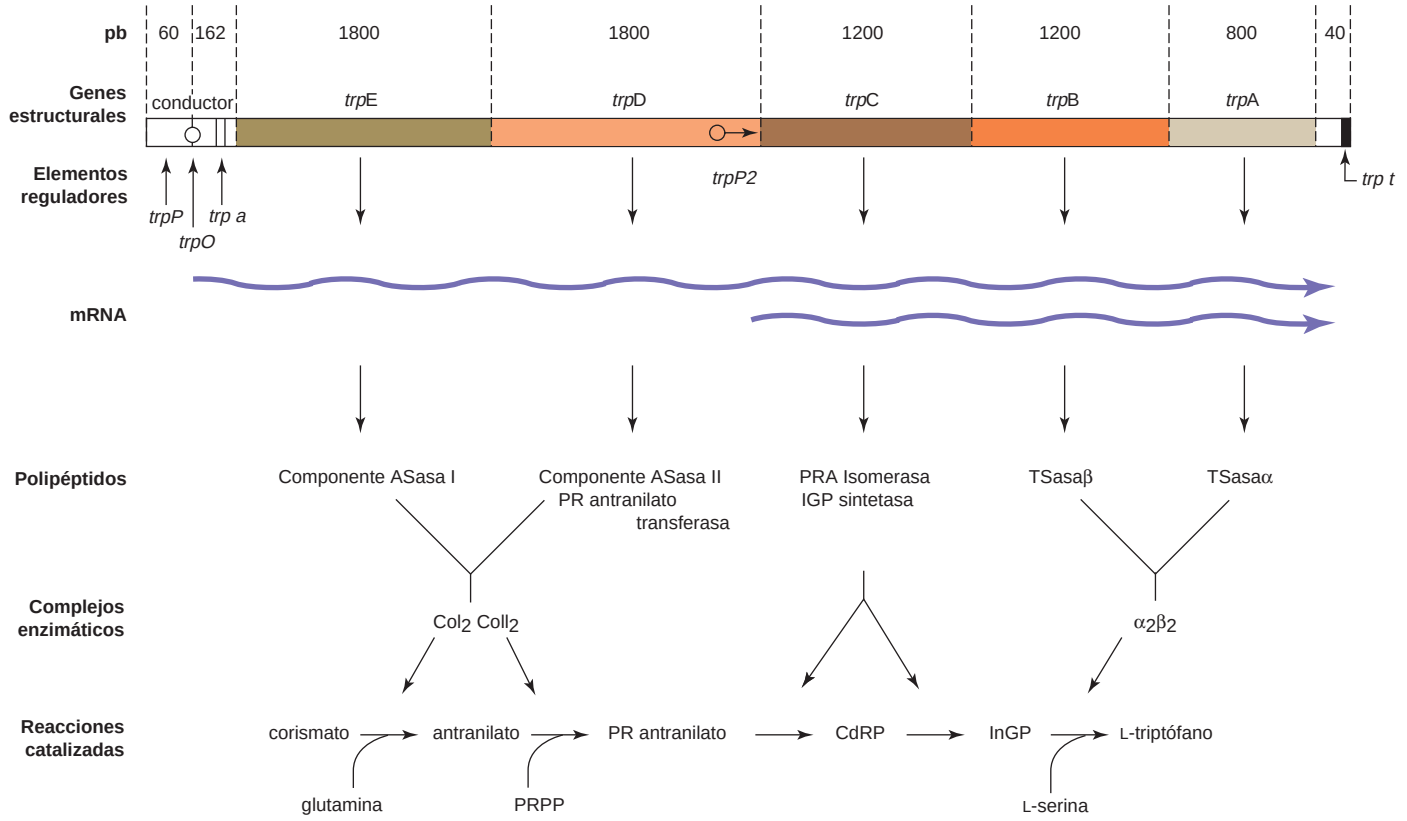


FIGURA 8.7
Genes del operón triptófano de *E. coli*.
Los elementos reguladores son el promotor primario (*trp*P), el operador (*trp*O), el atenuador (*trp* a), el promotor interno secundario (*trp*P2) y el terminador (*trp* t). La dirección de síntesis del mRNA se marca con líneas onduladas que representan los mRNA. CoI_2 y $CoII_2$ son los componentes I y II, respectivamente, del complejo antranilato sintetasa (ASasa); PR-antranilato es *N*-5′-fosforribosil-antranilato; CdRP es 1-(*o*-carboxi-fenilamino)-1-desoxirribulosa-5-fosfato; InGP es indol-3-glicerol fosfato; y PRPP es 5-fosforribosil-1-pirofosfato y TSasa es triptófano sintetasa.

Adaptado de Platt, T. En: J. H. Miller y W. Reznikoff (Eds.), The Operon. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1978, p. 263.*

corísmico. El triptófano actúa también como correpresor para bloquear la síntesis de nuevas moléculas de enzima a partir del operón triptófano. Por lo tanto, la retroinhibición es un mecanismo de control ejercido a corto plazo que tiene un efecto inmediato sobre la ruta metabólica, mientras que la represión, aún cuando necesita de un plazo de tiempo un poco más largo, tiene efectos más permanentes al reducir el número de moléculas de enzima.

El **represor triptófano** es un homodímero de dos subunidades idénticas de 108 aminoácidos cada una. En condiciones normales, se encuentran presentes en la célula unas 20 moléculas del dímero represor. El represor no se une por sí mismo al operador *trp*. Para ello debe debe unirse a dos moléculas de triptófano, y por tanto el represor sólo actuará *in vivo* en presencia de triptófano. Este es exactamente el caso contrario al del represor *lac*, que solamente se une al operador en ausencia de su inductor. Es interesante señalar que el represor *trp* regula también la transcripción de su propio gen, *trp*R. A medida que se acumula represor triptófano en las células, el complejo represor–triptófano se une a una región más arriba de este gen, bloqueando su transcripción y manteniendo unos 20 represores por célula. Otra diferencia entre el operón *lac* y el operón *trp* es que el operador *trp* está situado en su totalidad dentro del promotor *trp*, y no adyacente al mismo, como puede apreciarse en la Figura 8.8. La secuencia del operador es una región de simetría binaria, y el mecanismo para impedir la transcripción es el mismo que en el operón lactosa. La unión del complejo represor–correpresor al operador bloquea físicamente la unión de la RNA polimerasa al promotor.

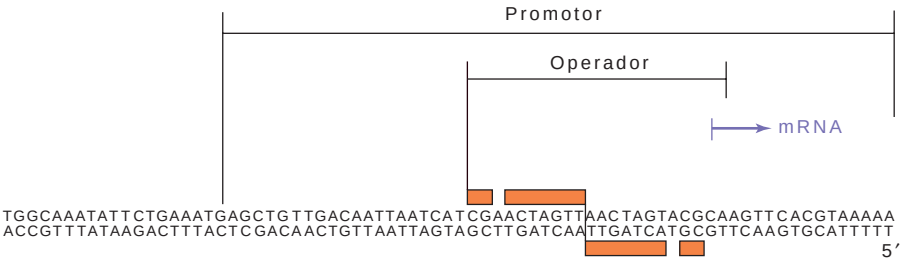


FIGURA 8.8
Secuencia de nucleótidos de los elementos de control del operón triptófano.
Las cajas situadas por encima y por debajo de la secuencia indican la presencia de secuencias simétricas en el operador.

La represión resulta en un descenso de aproximadamente unas 70 veces en la velocidad de inicio de la transcripción en el promotor *trp*. (En cambio, el nivel basal de los productos del gen *lac* es aproximadamente 1000 veces menor que el nivel inducido.) Sin embargo, el operón *trp* contiene elementos reguladores adicionales que imponen un control suplementario sobre su nivel de transcripción. Uno de estos sitios adicionales de control es un promotor secundario, denominado *trp*P2, localizado dentro de la secuencia codificadora del gen *trp*D (mostrado en la Figura 8.7). Este promotor no está regulado por el represor triptófano. La transcripción a partir de este sitio se produce constitutivamente a una velocidad relativamente baja, y finaliza en el mismo punto que la transcripción a partir del promotor regulado del operón global, *trp*P. El producto resultante de la transcripción a partir de *trp*P2 es un mRNA que contiene las secuencias codificadoras de *trp*CBA, los tres últimos genes del operón. Por tanto, del operón *trp* se originan dos mRNA policistrónicos, uno que contiene las secuencias codificadoras de los cinco genes estructurales, y otro que solamente posee los tres últimos genes. En condiciones de represión máxima, el nivel basal del mRNA que codifica los tres últimos genes es aproximadamente cinco veces mayor que el nivel basal de mRNA de los primeros dos genes.

No está clara la necesidad de un segundo promotor interno. Es posible que la mejor explicación provenga de la observación de que tres de las cinco proteínas no contienen triptófano; solamente los genes *trp*B y *trp*C contienen el único codón que especifica el triptófano. Por tanto, en condiciones de privación extrema de triptófano, estas dos proteínas no se sintetizarán, lo que impedirá que se active la ruta metabólica. Sin embargo, dado que los dos genes están situados más abajo del segundo promotor no regulado, sus productos proteicos estarán siempre presentes a un nivel basal, necesario para mantener abierta la ruta.

El operón triptófano posee un segundo sitio de control: la región atenuadora

Otro importante elemento de control del operón *trp* que no está presente en el operón *lac* es la región **atenuadora** (Figura 8.9). Está situada dentro de los 162 nucleótidos presentes entre el inicio de la transcripción desde *trp*P y el codón de iniciación del gen *trp*E. Su existencia se dedujo en primer lugar a partir de la identificación de mutaciones que se situaban en esta región del mapa y que incrementaban la transcripción de los cinco genes estructurales. Dentro de los 162 nucleótidos, denominados **secuencia conductora**, hay 14 codones adyacentes que empiezan con un codón de metionina y finalizan con un codón de terminación en fase. Estos codones está precedidos por un centro canónico de fijación a ribosomas, y podrían especificar un péptido conductor de 14 residuos. Este péptido nunca ha sido detectado en las células bacterianas, quizás porque es degradado muy rápidamente. Este centro de fijación a ribosomas funciona correctamente cuando su secuencia de DNA se coloca más arriba de un gen estructural, mediante el empleo de técnicas de DNA recombinante.

La región atenuadora proporciona a la RNA polimerasa una segunda oportunidad de regular la transcripción del operón triptófano, en función de las necesidades celulares de los enzimas de la biosíntesis del triptófano. En presencia de triptófano, la transcripción empieza en el promotor pero termina prematuramente al final de la

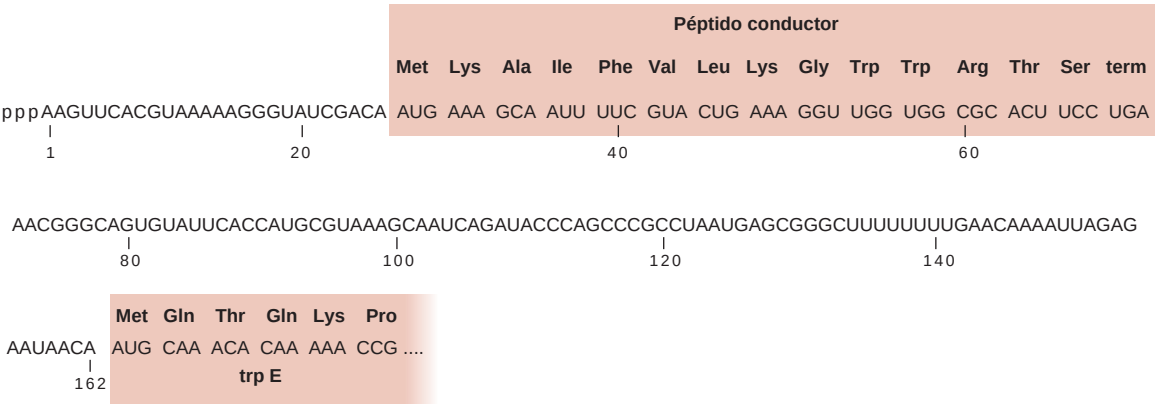


FIGURA 8.9
Secuencia nucleotídica del RNA conductor del operón triptófano. Los 14 aminoácidos del posible péptido conductor se indican sobre sus codones.

Adaptado con permiso de Oxender, D. L., Zurawski, G. y Yanofsky, C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *76:5524, 1979.*

región atenuadora, produciendo un transcrito corto de 140 nucleótidos. En ausencia de triptófano, la región atenuadora no tiene efecto sobre la transcripción, y se sintetiza el mRNA policistrónico completo con los cinco genes estructurales. Por tanto, el triptófano ejerce la misma influencia general sobre el operador y sobre el atenuador. En el operador participa en la represión de la transcripción y en el atenuador participa en la represión de la transcripción por las RNA polimerasas que han escapado a la represión. Se ha estimado que la atenuación afecta a la transcripción de los genes estructurales del triptófano en aproximadamente un factor de 10. Si se multiplica este valor por el factor de 70 atribuible a la desrepresión en el operador, se obtiene un intervalo de 700 veces en los niveles de transcripción del operón triptófano.

El mecanismo de la terminación de la transcripción en el sitio atenuador es un magnifico ejemplo de la interacción cooperativa existente entre transcripción y traducción bacterianas, encaminada a obtener los niveles deseados de un determinado mRNA. El péptido conductor (Figura 8.9) de 14 residuos contiene dos triptófanos adyacentes en las posiciones 10 y 11. Esto no es habitual, pues el triptófano es un aminoácido relativamente raro en *E. coli*. La presencia de estos dos codones de triptófano proporcionaron los primeros indicios de la implicación del $tRNA^{trp}$ en la atenuación. Si el contenido de triptófano en la célula es bajo, la cantidad de triptofanil-$tRNA^{trp}$ cargado será también baja, y los ribosomas pueden mostrarse incapaces de realizar la traducción al encontrarse con los dos codones de triptófano de la región del péptido conductor. Por tanto, se atascarán en este lugar de la secuencia conductora del RNA.

La secuencia de RNA de la región atenuadora puede adoptar diferentes estructuras secundarias (Figura 8.10). La posición del ribosoma dentro de la secuencia que codifica el péptido conductor determina la estructura secundaria que se formará. Esta estructura secundaria es, a su vez, reconocida (o detectada) por la RNA polimerasa que acaba de transcribir a través de la región codificadora del péptido conductor y que ahora se encuentra un poco más abajo. La estructura secundaria adoptada por el RNA cuando un ribosoma no está atascado en los codones del triptófano constituye una señal de terminación para la RNA polimerasa. En estas condiciones, la célula no necesita fabricar triptófano, y la transcripción se detiene después de la síntesis de un transcrito de 140 nucleótidos, que es rápidamente degradado. Por otra parte, la estructura secundaria que resulta cuando los ribosomas están atascados en los codones del triptófano no es reconocida como una señal de terminación, y la RNA polimerasa continúa a lo largo del gen *trp*E.

La atenuación de la transcripción constituye un mecanismo general de control en los operones para la biosíntesis de aminoácidos

La atenuación de la transcripción no está presente en los organismos eucarióticos porque la transcripción (en el núcleo) y la traducción (en el citoplasma) tienen lugar en

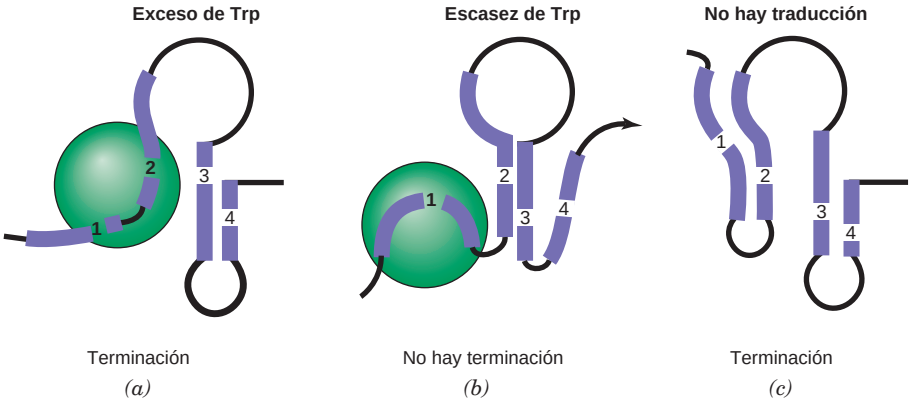


FIGURA 8.10
Modelo esquemático de la atenuación en el operon triptófano de *E. coli*.
(*a*) En condiciones de exceso de triptófano, el ribosoma (esfera verde) que traduce el RNA conductor recientemente transcrito sintetiza el péptido conductor completo. Durante la síntesis, el ribosoma se une a las regiones 1 y 2 del RNA e impide la formación de los tallos y bucles 1–2 o 2–3. El tallo y bucle 3–4 se puede formar libremente, constituyendo la señal para la molécula de RNA polimerasa (no mostrada) para que termine la transcripción. (*b*) En condiciones de escasez de triptófano, el triptofanil-tRNA^{trp} será limitante, y el ribosoma se atascará en los codones de triptófano adyacentes al inicio de la región 1, codificadora del péptido conductor. Dado que sólo está enmascarada la región 1, se formará el tallo y bucle 2–3, excluyéndose la formación del tallo y bucle 3–4 necesario como señal de terminación de la transcripción. Por tanto, la RNA polimerasa continuará la transcripción de los genes estructurales. (*c*) En condiciones en las que no se traduce el péptido conductor, se forman el tallo y bucle 1–2, impidiendo así la formación del tallo y bucle 2–3, y permitiendo, por consiguiente, la formación del tallo y bucle 3–4. Esta es una señal de terminación de la transcripción.
Reproducido con permiso de Oxender, D. L., Zurawski, G., y Yanofsky, C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *76:5524, 1979.*

diferentes compartimientos celulares separados por la membrana nuclear. Por esta razón, no puede utilizarse un relación directa entre transcripción y traducción como una forma de regulación génica. La atenuación es un fenómeno común de la expresión génica bacteriana y tiene lugar en al menos otros seis operones que codifican enzimas pertenecientes a las vias de biosíntesis de aminoácidos. La Figura 8.11 muestra las correspondientes secuencias **peptídicas conductoras** especificadas por cada uno de estos operones. En cada caso, el péptido conductor contiene varios codones del aminoácido que constituye el producto final de la ruta. El caso más extremo es el de un péptido conductor de 16 residuos del operón de la histidina, que contiene siete histidinas contiguas. La privación de histidina da como resultado un descenso en la

Operón	Secuencias peptídicas conductoras	Aminoácidos reguladores
his	Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp	His
pheA	Met-Lys-His-Ile-Pro-Phe-Phe-Phe-Ala-Phe-Phe-Phe-Thr-Phe-Pro	Phe
thr	Met-Lys-Arg-Ile-Ser-Thr-Thr-Ile-Thr-Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Thr-Thr-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly	Thr Ile
leu	Met-Ser-His-Ile-Val-Arg-Phe-Thr-Gly-Leu-Leu-Leu-Leu-Asn-Ala-Phe-Ile-Val-Arg-Gly-Arg-Pro-Val-Gly-Gly-Ile-Gln-His	Leu
ilv	Met-Thr-Ala-Leu-Leu-Arg-Val-Ile-Ser-Leu-Val-Val-Ile-Ser-Val-Val-Val-Ile-Ile-Ile-Pro-Pro-Cys-Gly-Ala-Ala-Leu-Gly-Arg-Gly-Lys-Ala	Leu, Val, Ile

FIGURA 8.11
Secuencias de los péptidos conductores especificados por los operones biosintéticos de *E. coli*.
Todas las secuencias de péptidos conductores contienen múltiples copias del (los) aminoácido(s) sintetizado(s) por los enzimas codificados por el operón.

cantidad de histidinil-tRNA^{his} cargado y un gran aumento en la transcripción del operón *his*. La secuencia de nucleótidos de la región atenuadora sugiere que el atascamiento del ribosoma en los codones de histidina influye también sobre la formación de lazos en horquilla alternativos, uno de los cuales tiene el aspecto de un lazo de terminación seguido por varios residuos de U. Al contrario del operón *trp*, la transcripción del operón *his* está regulada basicamente por atenuación; no posee un operador reconocible por una proteína represora. En cambio, el ribosoma actúa más bien como una proteína de regulación positiva, similar al complejo cAMP–CAP tratado en la sección del operón *lac*. Si el ribosoma se encuentra unido (es decir, atascado) al sitio atenuador, aumenta la transcripción de los genes situados más abajo. Si el ribosoma no se encuentra unido se reduce en gran medida la transcripción de estos genes.

La transcripción de algunos de los operones mostrados en la Figura 8.11 puede ser atenuada por más de un aminoácido. Por ejemplo, el **operón *thr*** es atenuado por treonina o isoleucina; el **operón *ilv*** es atenuado por leucina, valina o isoleucina. Este efecto puede explicarse en cada caso por el atascamiento del ribosoma en el codón correspondiente, lo que a su vez interfiere con la formación del lazo de terminación. Es posible que en algunos de los péptidos conductores más largos, sea necesario el atascamiento del ribosoma en más de un codón para que se dé el máximo de transcripción a través de la región de atenuación.

8.5 OTROS OPERONES BACTERIANOS

La síntesis de proteínas ribosómicas se regula de manera coordinada

Muchos operones bacterianos poseen los mismos mecanismos reguladores generales que los operones *lac*, *his* y *trp* comentados en la Sección 8.4. Sin embargo, cada operón ha desarrollado sus propias características. Un ejemplo interesante son los genes estructurales de las 70 o más proteínas del ribosoma (Figura 8.12). Cada ribosoma contiene una copia de cada **proteína ribosómica** (excepción hecha de la proteína L7/L12, de la que existen probablemente cuatro copias). Por tanto, las 70 proteínas son necesarias en cantidades equimolares, por lo que es lógico que su síntesis esté regulada de forma coordinada. Seis operones, que contienen aproximadamente la mitad de los genes de las proteínas ribosómicas, se distribuyen en dos grupos principales de genes. Una de los grupos contiene cuatro operones adyacentes (*str*, *Spc*, *S10* y *a*), y el otro grupo tiene dos operones (L11 y *rif*) en otro lugar del cromosoma de *E. coli*. No parece existir una pauta definida para la distribución de estos genes entre los diferentes operones. Algunos operones contienen genes de proteínas pertenecientes a una sola subunidad ribosómica; otros contienen genes de proteínas de las dos subunidades. Además de los genes estructurales de las proteínas ribosómicas, estos operones contienen también genes de otras proteínas (relacionadas). Por ejemplo, el operón *str* contiene genes de los dos **factores de elongación de la traducción** solubles, EF-Tu y EF-G, así como genes de algunas proteínas de la subunidad ribosómica 30S. El operón *a* contiene genes de proteínas de las dos subunidades ribosómicas, 30S y 50S, además del gen de la subunidad α de la RNA polimerasa. El operón *rif* contiene los genes de las subunidades β y β' de la RNA polimerasa y genes de proteínas ribosómicas.

Operón	Proteína reguladora	Proteínas especificadas por el operón
Spc	S8	L14-L24-L5-S14-S8-L6-L18-S5-L15-L30
S10	L4	S10-L3-L2-L4-L23-S19-L22-S3-S17-L16-L29
str	S7	S12-S7-EF•G-EF•Tu
α	S4	S13-S11-S4-α-L17
L11	L1	L11-L1
rif	L10	L10-L7-β–β′

FIGURA 8.12
Operones que contienen genes de proteínas ribosómicas de *E. coli*. Los genes de componentes proteicos de las subunidades ribosómicas grande (L) y pequeña (S) de *E. coli* se encuentran agrupados en diversos operones. Algunos de estos operones contienen también genes de las subunidades α, β y β' de la RNA polimerasa y de los factores de síntesis proteica EF-G y EF-Tu. Al menos uno de los productos proteicos de cada operón suele regular la expresión del mismo (véase texto).

Una característica común a los seis operones ribosómicos es que su expresión está regulada por el producto de uno de sus propios genes estructurales; es decir, están **autorregulados**. El mecanismo preciso de esta autorregulación varía considerablemente en cada operón, y sólo se conoce en parte. Sin embargo, en algunos casos la regulación se produce a nivel de la traducción, no de la transcripción, como se ha explicado para los operones *lac* y *trp*. Después de formarse el mRNA policistrónico, la proteína ribosómica "reguladora" se une al mismo y determina qué regiones se van a traducir, si acaso se transcribe alguna. En general, la proteína ribosómica que regula la expresión de su propio operón o de parte de él se encuentra asociada a uno de los RNA ribosómicos (rRNA) del ribosoma intacto. Esta proteína ribosómica posee una elevada afinidad por el rRNA y una menor afinidad por una o más regiones de su propio mRNA. Por lo tanto, se produce una competencia entre el rRNA y el mRNA del operón por la unión a la proteína ribosómica. Cuando la proteína ribosómica alcanza una concentración superior a la del rRNA libre, se une a su propio mRNA, evitando así la iniciación de la síntesis proteica en una o más de las secuencias codificadoras de este mRNA (Figura 8.13). Al formarse más ribosomas, se utiliza el exceso de esta proteína ribosómica particular, de modo que puede reanudarse la traducción de su mRNA.

La respuesta estricta controla la síntesis de rRNA y tRNA

Las bacterias pueden responder de diversas maneras a situaciones de emergencia, es decir, a momentos de **estrés general extremo**. Una de estas situaciones se da cuando la célula no tiene una reserva suficiente de aminoácidos para mantener la síntesis proteica. En estas condiciones, la célula reacciona con la denominada **respuesta estricta**, un mecanismo que reduce la síntesis de rRNA y tRNA en aproximadamente 20 veces. Esta respuesta hace que muchas de las actividades de la cé-

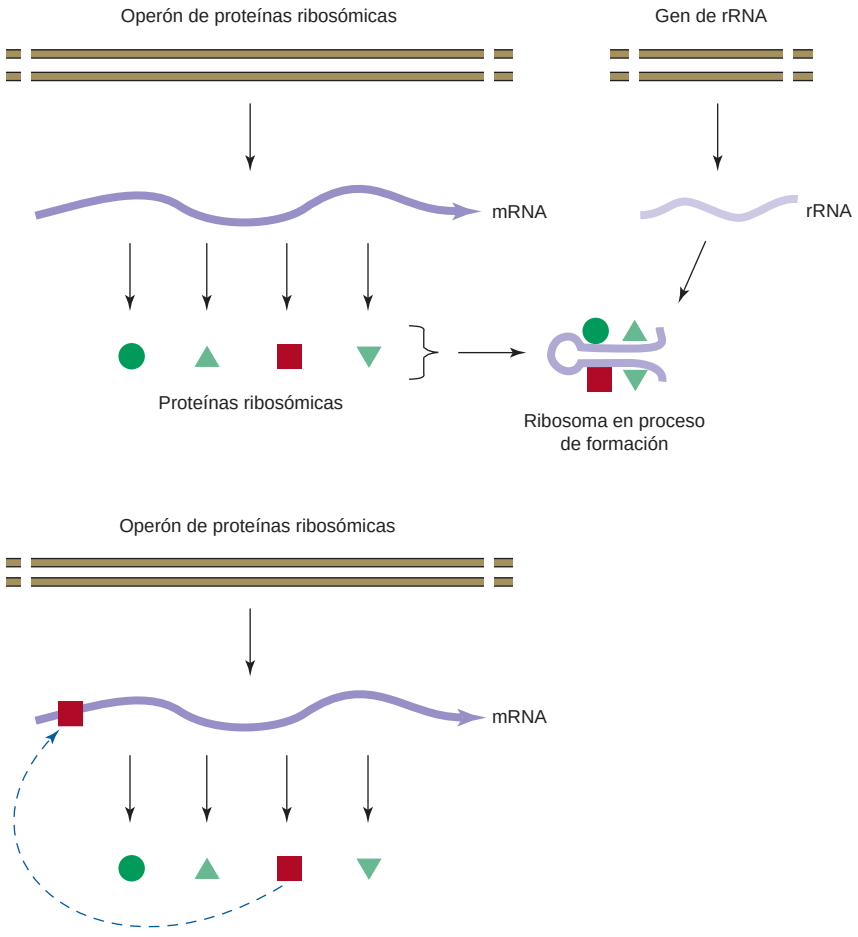


FIGURA 8.13
Autorregulación de la síntesis de proteínas ribosómicas.
En el caso de que no haya rRNA libre para la formación de las nuevas subunidades ribosómicas, las proteínas ribosómicas individuales se unen al mRNA policistrónico de su propio operón, bloqueando la traducción.

lula queden suspendidas hasta que se produzca una mejora de las condiciones. Los mRNA resultan menos afectados, pero su síntesis también sufre un descenso de aproximadamente tres veces.

La respuesta estricta está provocada por la presencia de un tRNA descargado en el sitio A del ribosoma. Esto ocurre cuando la concentración del correspondiente tRNA cargado es muy baja. En primer lugar, claro está, se detiene la elongación del péptido por el ribosoma. Esta situación hace que una proteína denominada **factor de restricción**, producto del gen *rel*A, sintetice **guanosina tetrafosfato** (ppGpp) y **guanosina pentafosfato** (pppGpp), a partir de ATP y GTP o GDP, tal como se muestra en la Figura 8.14.

El factor de restricción se encuentra débilmente asociado con algunos ribosomas de la célula, pero no con todos. Es posible que la ocupación del sitio A por un tRNA descargado induzca un cambio conformacional en el ribosoma, que, a su vez, active al factor de restricción asociado. No se conocen las funciones exactas de la ppGpp y la pppGpp. Sin embargo, parece ser que inhiben la iniciación de la transcripción de los genes del rRNA y del tRNA. Además, afectan en mayor o menor medida la transcripción de algunos operones.

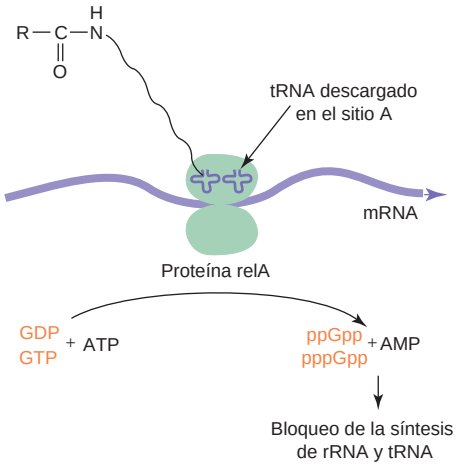


FIGURA 8.14
Control estricto de la síntesis proteica en *E. coli*.
Durante los períodos de carencia extrema de aminoácidos, un tRNA descargado en el sitio A del ribosoma activa la proteína relA para que sintetice ppGpp y pppGpp que, a su vez, están implicados en la disminución de la transcripción de los genes que codifican los rRNA y los tRNA.

8.6 TRANSPOSONES BACTERIANOS

Los transposones son segmentos móviles de DNA

Hasta ahora hemos abordado la regulación de los genes bacterianos que ocupan posiciones fijas en el cromosoma. Sus posiciones con respecto a los genes vecinos no cambian. La inmensa mayoría de los genes bacterianos son de este tipo. De hecho, los mapas genéticos de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* son muy similares, lo que indica la ausencia de un grado considerable de movimiento evolutivo en la mayor parte de genes dentro del cromosoma bacteriano. Sin embargo, existe un tipo de genes bacterianos cuyas copas génicas recién duplicadas "saltan" a otro sitio genómico con una frecuencia de aproximadamente 10^{-7} por generación, el mismo índice de las mutaciones puntuales espontáneas. Los segmentos móviles de DNA que contienen estos genes se denominan **elementos transponibles** o **transposones** (Figura 8.15). La regulación de los genes en los transposones bacterianos posee interesantes características; algunas controlan la presencia y la transposición del propio transposón, mientras que otras, generalmente genes de resistencia a antibióticos, pueden conferir a la bacteria una ventaja selectiva frente a otras bacterias.

Los transposones se detectaron por primera vez como inserciones raras de DNA extraño en genes estructurales de operones bacterianos. Estas inserciones interfieren generalmente con la expresión del gen estructural en el que se han insertado y de todos los genes situados más abajo en el operón. Esto no es sorprendente, ya que en potencia pueden destruir el marco de lectura de traducción, introducir señales de terminación, afectar a la estabilidad del mRNA y así sucesivamente. Se han aislado y caracterizado exhaustivamente muchos transposones y sus lugares de inserción utilizando las técnicas del DNA recombinante.

Los transposones varían enormemente en longitud. Algunos tienen unos pocos miles de pares de bases y sólo contienen dos o tres genes; otros tienen muchos miles de pares de bases de longitud y poseen varios genes. A veces, dentro de un gran transposón pueden encontrarse varios transposones más pequeños. Todos los transposones activos contienen al menos un gen que codifica una **transposasa**, un enzima necesario para que se produzca el "salto" o transposición. A menudo contienen genes codificadores de resistencia a antibióticos o a metales pesados. La mayoría de las transposiciones implican la generación de una copia suplementaria del transposón, y la inserción de esta copia en otro lugar. La copia original del transposón es la misma tanto antes como después de la duplicación; es decir, la copia donante no está afectada por la inserción de su duplicado en el sitio receptor. Los transposones contienen cortas **repeticiones invertidas terminales** que son esenciales para el mecanismo de inserción, y que a menudo se utilizan para definir los dos límites del transposón. Parece ser que los múltiples sitios en los que pueden insertarse la mayoría de transposones poseen secuencias al azar; sin embargo, algunos transposones tienen tendencia a insertarse en "puntos calientes" específicos. El transposón duplicado puede insertarse en una molécula de DNA diferente de la de su dador.

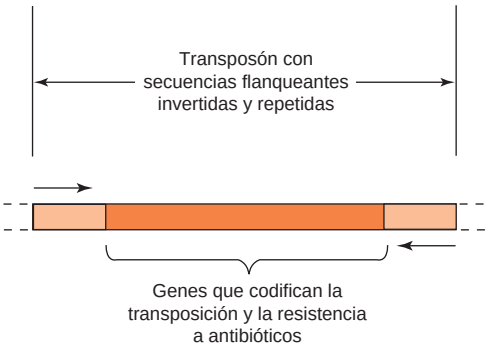
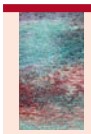


FIGURA 8.15
Estructura general de los transposones.
Los transposones son segmentos móviles relativamente raros de DNA que contienen genes que codifican su propio reordenamiento y (generalmente) genes que especifican resistencia a varios antibióticos



APLICACIÓN CLÍNICA 8.1
Resistencia transmisible a múltiples fármacos

Las bacterias patógenas son cada vez más resistentes a un gran número de antibióticos, lo que es motivo de alarma entre muchos médicos. Se han observado muchos casos en los que una cepa bacteriana en un paciente que está siendo tratado con un antibiótico se convierte de repente en resistente a este antibiótico y, simultáneamente, a algunos otros antibióticos, a pesar de que no haya estado previamente expuesta a ellos. Esto sucede cuando las bacterias adquieren súbitamente un plásmido procedente de otra cepa bacteriana que contiene varios transposones diferentes, que contienen cada uno de ellos uno o más genes de resistencia a antibióticos. Ejemplo de ello son los genes de la β-lactamasa, que inactiva penicilinas y cefalosporinas, de la cloranfenicol acetiltransferasa, que inactiva el cloranfenicol, y las fosfotransferasas, que modifican aminoglucósidos como la neomicina y la gentamicina.

Neu, H. C. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257:1064, 1992.

Los transposones se encuentran con frecuencia en plásmidos que pasan de una cepa bacteriana a otra, y son el origen de la resistencia súbitamente adquirida por la bacteria a uno o más antibióticos (Apli. Clín. 8.1).

Al igual que los operones bacterianos, cada transposón o conjunto de transposones posee sus propias características distintivas. Como ejemplo de sus propiedades generales se describirá el bien caracterizado transposón *Tn3*.

El transposón *Tn3* contiene tres genes estructurales

El **transposón *Tn3*** contiene 4957 pb, de los que forman parte 38 pares de bases de un extremo, que se encuentran en forma de repetición invertida en el otro extremo (Figura 8.16). El *Tn3* contiene tres genes. Uno de ellos codifica el enzima **β-lactamasa**, que hidroliza la ampicilina y que hace que la célula sea resistente a ese antibiótico. Los otros dos genes, *tnp*A y *tnp*R, codifican, respectivamente, una **transposasa** y una **proteína represora**. La transposasa se compone de 1021 aminoácidos y se une a DNA monohebra. Reconoce los extremos repetitivos del transposón y participa en el corte del sitio receptor en el que se insertará la nueva copia del mismo. El producto del gen *tnp*R es una proteína de 185 aminoácidos. En su papel de represor, controla la transcripción de su propio gen y del de la transposasa. Los genes *tnp*A y *tnp*R se transcriben en direcciones opuestas a partir de una región de control de 163 pares de bases localizada entre los dos genes, y que es reconocida por el represor. El producto de *tnp*R participa también en el proceso de recombinación que da como resultado la inserción del nuevo transposón, pero no afecta a la transcripción del gen de resistencia a la ampicilina.

Las mutaciones en el gen de la transposasa disminuyen generalmente la frecuencia de la transposición de *Tn3*. Las mutaciones que destruyen la función represora del producto de *tnp*R aumentan la frecuencia de transposición. Estas muta-

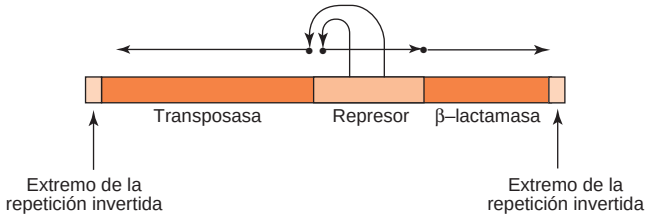


FIGURA 8.16
Componentes funcionales del transposón *Tn3*.
El análisis genético y de las secuencias de DNA muestra que existen al menos cuatro tipos de regiones: los extremos con repetición invertida; un gen del enzima β-lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina y antibióticos relacionados; un gen que codifica un enzima necesario para la transposición (transposasa) y un gen de una proteína represora que controla la transcripción de los genes de la transposasa y del mismo represor. Las flechas horizontales indican la dirección de la transcripción del DNA en varias regiones.
Adaptado de Cohen, S. N. y Shapiro, J. A. Sci. Am. *242:40, 1980. W. H. Freeman and Company, Copyright © 1980.*

ciones desreprimen el gen *tnp*A; en consecuencia, aumenta el número de moléculas de transposasa, lo que a su vez incrementa la formación de más copias del transposón. También causan la desrepresión del gen *tnp*R, la cual no tiene efectos sobre el sistema, pues el represor es inactivo.

La importancia de los transposones localizados en plásmidos ha ido aumentando en los últimos años en relación con el uso clínico de antibióticos. Los plásmidos que no han sido alterados en el laboratorio suelen contener genes que facilitan su transferencia de una bacteria a otra. Al transferirse los plásmidos (p. ej., entre diferentes cepas de bacterias infecciosas), sus transposones, que contienen **genes de resistencia a los antibióticos,** se trasladan a nuevas cepas bacterianas. Una vez en una nueva bacteria, el transposón puede duplicarse en el cromosoma y establecerse permanentemente en la línea celular. El resultado es que más y más cepas bacterianas patógenas se han vuelto resistentes a un número cada vez mayor de antibióticos.

8.7 EXPRESIÓN GÉNICA EUCARIÓTICA

Como en los procariotas, la transcripción en los organismos eucarióticos está regulada para garantizar una respuesta apropiada a las exigencias biológicas. Sin embargo, y especialmente en los organismos multicelulares, la determinación del destino celular durante el desarrollo y la expresión de genes especializados en tipos celulares específicos también está regulada transcripcionalmente. Agunos genes (los denominados genes constitutivos) se expresan en la mayoría de las células, otros genes son activados cuando hace falta, además, algunos genes se encuentran permanentemente inactivos a excepción de unos pocos tipos celulares. En las células eucarióticas la membrana nuclear actúa como una barrera que permite selectivamente que algunas proteínas lleguen hasta el DNA, mientras que otras son mantenidas en el citosol. Por lo tanto, una de las diferencias entre la expresión génica en humanos y en la mayoría de organismos procarióticos es la activación e inactivación específica de algunos genes en las células diferenciadas.

Mientras que en las bacterias una sola RNA polimerasa es responsable de la transcripción de todos los RNA (tRNA, rRNA y mRNA), en los organismos eucarióticos la tarea está dividida entre tres RNA polimerasas distintas (véase la p. 210). La **RNA polimerasa I** transcribe los genes del rRNA, la **RNA polimerasa II** los genes que codifican las proteínas y cuyos transcritos se convierten en mRNA y la **RNA polimerasa III** los genes de los tRNA y de la mayoría de los pequeños RNA. Aunque algunos principios de la activación y el control de los genes eucarióticos son aplicables a las tres RNA polimerasas, en este apartado nos centraremos en la transcripción por la RNA polimerasa II. La RNA polimerasa II está compuesta de al menos diez subunidades diferentes, cuyo tamaño varía entre 10 y 220 kDa. Algunas de las subunidades de la RNA polimerasa II también forman parte de los complejos de las RNA polimerasa I y III, mientras que otras son exclusivas de la RNA polimerasa II. La subunidad mayor de la RNA polimerasa II tiene, según la especie, hasta 52 repeticiones del motivo aminoacídico PTSPSYS en su región C-terminal (o en su dominio C-terminal, CTD). Una de las características distintivas de estas repeticiones es que las treoninas (T), serinas (S) y la tirosina (Y) pueden estar fosforiladas.

Para una mejor comprensión de la regulación de la transcripción en los eucariotas es útil recordar la organización del DNA en la **cromatina** y el papel de la modificación del DNA, en especial la **metilación** de las bases, en la activación génica. Además, consideraremos cómo la RNA polimerasa II se posiciona en el lugar adecuado del promotor de un gen para proceder a su transcripción mediante la formación de un complejo de preiniciación del que forman parte **factores de transcripción generales (TF)** y la RNA polimerasa II. A continuación, examinaremos cómo puede regularse la actividad de genes específicos mediante el uso de **potenciadores**, **sitios de unión de factores de transcripción** y **sitios de formación de la RNA polimerasa**. Finalmente, discutiremos la activación de la transcripción por factores de transcripción específicos, algunas de sus características generales y cómo son regulados.

El DNA eucariótico se une a las histonas para formar la cromatina

Segmentos de DNA eucariótico se enrollan en torno a octámeros de **proteínas histonas** que contienen dos moléculas de cada una de la histonas H2A, H2B, H3 y H4

para formar los **nucleosomas** (véase la p. 68). La asociación de las histonas con el DNA es mediante interacciones electrostáticas entre un elevado número de residuos de lisina cargados positivamente y la cadena fosfodiéster del DNA cargada negativamente. En la mayoría de células, la H1 o la H5 se unen una vez se ha establecido la asociación octámero-DNA. La longitud del DNA asociado con cada octámero se ha estimado a partir de la accesibilidad diferencial del DNA a diversas nucleasas. Unos 200 pb constituyen una unidad nucleosómica individual, con 130-160 pb en contacto directo con el octámero. Parte del DNA restante está unido a las histonas H1 o H5 y el resto es el **DNA internucleosómico.** Aunque la interacción octámero-DNA no es específica de secuencia, se han observado algunos patrones de asociación dependientes de secuencia. Cuando, por ejemplo, la doble hélice del DNA se curva debido a la presencia de una región rica an A-T, el surco menor de la hélice está orientado hacia el interior del nucleosoma. Por el contrario, en las regiones ricas en G-C el surco estrecho se encuentra en el exterior del octámero de histona núcleo. A pesar de estas tendencias, de momento no es posible predecir qué secuencias de una doble hélice de DNA se encontrarán con los surcos mayor y menor en el exterior del octámero de histona núcleo. El posicionamiento es importante porque el **complejo de iniciación de la transcripción** y la unión de otras proteínas que afectan a la expresión génica necesitan acceder a los surcos del dúplex del DNA. Las interacciones específicas de secuencia se establecen mediante puentes de hidrógeno en los que participan los grupos de los bordes de los pares de bases del surco menor y mayor. Cuando el DNA se encuentra enrollado en torno al octámero de histonas, las secuencias específicas de DNA a las que se unen los factores de transcripción pueden estar ocluidas. No es necesario disociar completamente el DNA del nucleosoma para hacer posible el acceso a las secuencias específicas. Haciendo girar la hélice del DNA de manera que haya, por ejemplo, un desplazamiento de 5 pb en la asociación del DNA con el octámero de histonas es posible establecer diferentes contactos con el surco mayor y menor en la superficie exterior del nucleosoma (Figura 8.17).

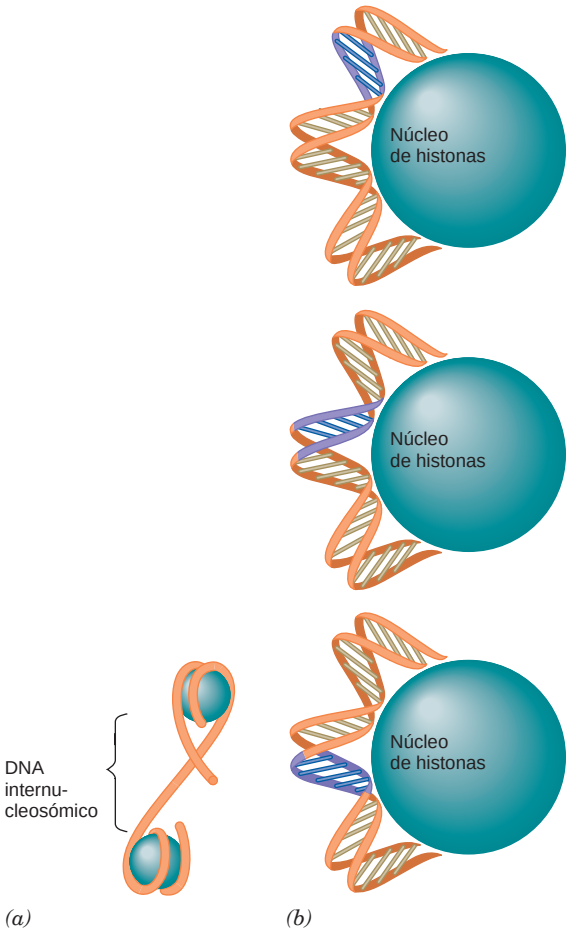


FIGURA 8.17
El acceso a secuencias específicas en los surcos mayor y menor del DNA depende del posicionamiento de los nucleosomas.
(*a*) El DNA enrollado alrededor del octámero de histonas, formado por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, se denomina particula núcleo nucleosómica. En la mayoría de casos, la histona H1 o H5 (no mostrada) se asocia con el DNA en donde se inicia el enrollamiento del DNA en torno al octámero. El DNA que se encuentra entre los nucleosomas se denomina DNA internucleosómico. El DNA alrededor del núcleo de histonas es más estable que el DNA internucleosómico frente a agentes como la nucleasa micrococal. (*b*) En el nucleosoma, el lado de la hélice que mira hacia afuera de núcleo de histonas es accesible, pero la cara que mira hacia adentro no lo es. Si hacemos girar la hélice en relación al núcleo proteico del nucleosoma y seguimos la posición de los mismos cinco pares de bases, el acceso a los surcos mayor y menor para otras interacciones depende de si el par de bases se encuentra en el interior o en el exterior del nucleosoma.
Adaptado de Wolffe, A. P. Chromatin: Structure and Function, *3rd ed. New York: Academic Press, 1998.*

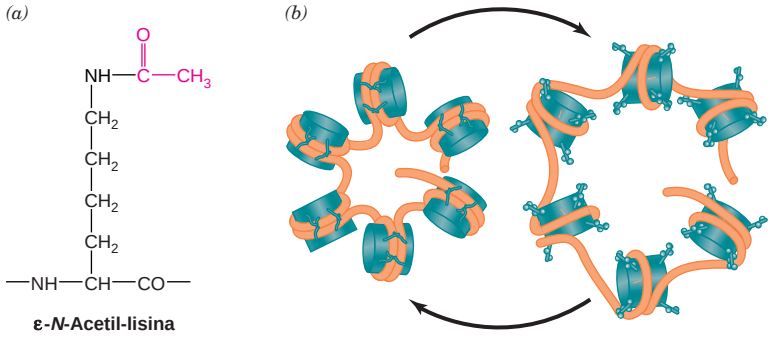


FIGURA 8.18
La fuerza de la interacción entre las histonas y el DNA se modifica por la acetilación de residuos de lisina en el N-terminal de las histonas.
Las histonas que constituyen el octámero tienen numerosos residuos de lisina, que gracias a su cadena lateral cargada positivamente pueden interaccionar con las cargas negativas de las uniones fosfodiéster del DNA. La modificación de las lisinas por acetilación reemplaza la carga positiva con un grupo acetilo neutral (mostrado en rojo en (*a*)) y debilita la interacción electrostática entre el octámero y el DNA. Este proceso es reversible (*b*), y la acetilación y la desacetilación permiten relajar o condensar la estructura de la cromatina.
Modificado de Wolffe, A. P. Sci. Med. *6:28, 1999.*

Los genes que no son transcritos en una determinada célula forman heterocromatina altamente condensada. En cambio, las regiones del DNA activas en la transcripción forman estructuras más abiertas y menos condensadas. Esta diferencia se debe al menos en parte a la modificación postraducción de las histonas. La **acetilación** del grupo *ε*-amino de los residuos de lisina cerca del extremo N-terminal de las histonas reduce la carga positiva de las histonas y de esta forma debilita la atracción electrostática entre las histonas y el DNA. En general, la acetilación de las histonas contribuye a la activación de la expresión génica, mientras que la desacetilación revierte el efecto. La acetilación de las histonas, y el consiguiente reposicionamiento de los nucleosomas, producido por la desestabilización de las interacciones histona DNA, es importante para facilitar el acceso a secuencias específicas del DNA (Figura 8.18).

La posición relativa de los nucleosomas también puede verse afectada por el **complejo SWI/SNF**, identificado y descrito por vez primera en la levadura *S. cerevisiae* y denominado del inglés mating type **swi**tching and **s**ucrose **n**on**f**ermenting strains (cambio del tipo de apareamiento y cepas no fermentadoras de sacarosa). Este complejo de unas diez proteínas interacciona con el dominio C-terminal de la subunidad grande de la RNA polimerasa II. Su función es la desorganización dependiente de ATP de los grupos de nucleosomas. Tiene como resultado la apertura de regiones del DNA para la interacción con factores de transcripción y así facilitar la activación génica. Hay menos complejos SWI/SNF en la célula que genes por activar, lo que indica que el complejo SWI/SNF actúa de manera catalítica (véase la Apli. Clín. 8.2).

La metilación del DNA está asociada con la inactivación génica

La **metilación** del DNA humano está restrigida a la formación de 5-metilcitosina (Figura 8.19) a partir de citosina en la secuencia CG en ambas cadenas. Alrededor del 70% de las secuencias CG del DNA humano están metiladas. La metilación está implicada en el **marcaje** del DNA genómico. Los diferentes patrones de metilación heredados del esperma o del óvulo determinan la elección de la expresión alélica. Los patrones de metilación se conservan durante la replicación por acción de una hemimetilasa (que metila solamente una de las dos cadenas que continen el CG), aunque también debe existir una metilasa *de novo*. Hasta ahora tan solo se ha identificado la hemimetilasa.

Los términos "**islas CG**" o "**regiones ricas en CG**" se encuentran a menudo en la literatura sobre metilación del DNA. La secuencia CG está subrepresentada en el genoma. Ello se debe probablemente a la acumulación durante muchas generaciones de transiciones de C a T causadas por la desaminación de la 5-metilcitosina.

APLICACIÓN CLÍNICA 8.2
Síndrome de Rubinstein-Taybi

La regulación de la acetilación de las histonas influye sobre la activación y la inactivación de la expresión génica. Los dos principales enzimas responsables de la acetilación de las histonas en las células de los mamíferos son las acetil transferasas p300 y CBP. P300 se nombró en referencia a su masa molecular y CBP se refiere a proteína de unión a CREB, siendo CREB un factor de transcripción regulado por cAMP. Estas acetil transferasas facilitan la activación de genes específicos en asociación con CREB y otros factores de transcripción, y provocan la relajación de la estructura de la cromatina, debilitando las interacciones histona-DNA.

El síndrome de Rubinstein-Taybi, caracterizado por retraso mental y otras anomalías del desarrollo, está provocado por mutaciones de la secuencia del gen *CBP*. Las alteraciones que han sido identificadas incluyen mutaciones puntuales, pequeñas deleciones y reordenamientos. Los defectos más severos corresponden a las mutaciones más extensas. La pérdida completa del gen *CBP* es probablemente letal.

Petrij, F., Giles, R. H., Dauwerse, H. G., et al. Rubinstein–Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376:348, 1995; y Wolffe, A. P. The cancer–chromatin connection. *Sci. Med.* 6:28, 1999.

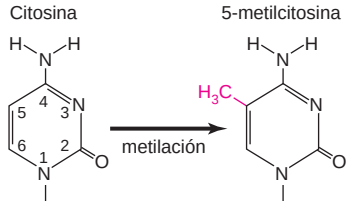


FIGURA 8.19
La base metilada más común en humanos es la 5-metil citosina.

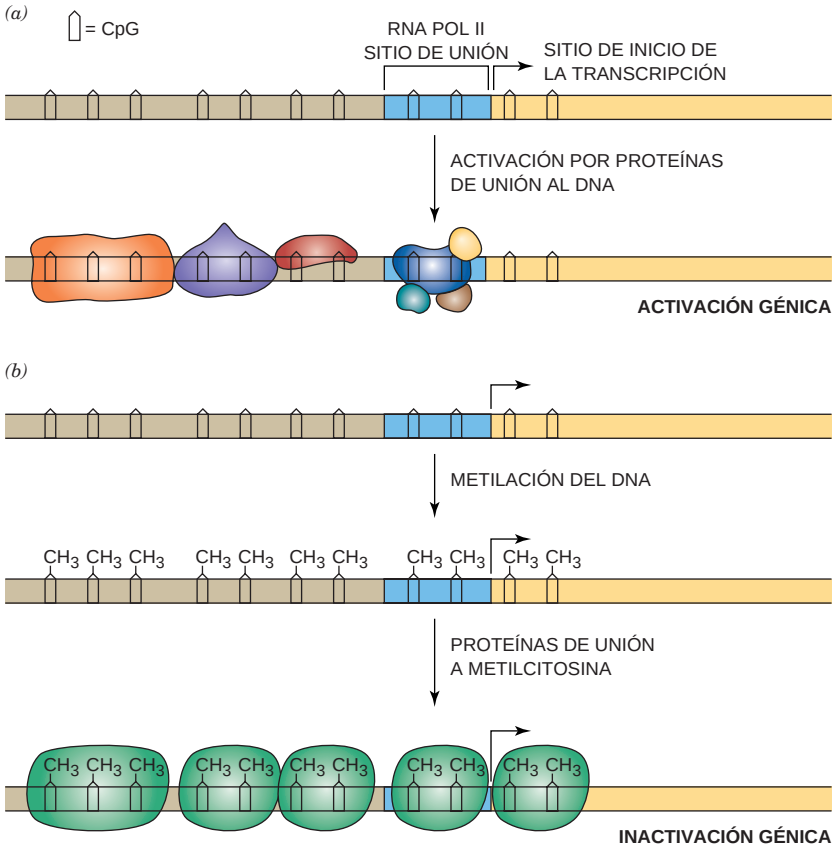


FIGURA 8.20
La metilación del DNA altera la actividad génica.
Para maximizar la transcripción de la mayoría de genes es necesario que los factores de transcripción reconozcan y se unan a secuencias de DNA específicas en la región del promotor. Su interacción con el DNA y con los factores generales de transcripción en el complejo de iniciación de la transcripción de la RNA polimerasa II induce la expresión del gen. La metilación del DNA, específicamente, la formación de 5-metil citosina, crea una nueva diana para la interacción proteína-DNA. La asociación de proteínas de unión a 5-metil citosina a DNA metilado puede bloquear la capacidad de los factores de transcripción para encontrar y unirse al DNA. Esta inhibición no es usualmente por competición por la unión a secuencias específicas, sino por impedimento estérico.
Modificado de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. Molecular Biology of the Cell. *New York: Garland Publishing, 1994.*

El mantenimiento de los CG presumiblemente se debe a la presión selectiva para mentener las regiones reguladoras, y las islas CG se encuentran más a menudo en las regiones promotoras.

La metilación del DNA frecuentemente se correlaciona con la falta de actividad transcripcional. Se cree que están implicadas proteínas que reconocen y se unen al DNA metilado, impidiendo así la unión de los factores de transcripción. La metilación del DNA se correlaciona con la desacetilación de las histonas; se dispone, pues, de dos maneras para reprimir la transcripción en un lugar específico (Figura 8.20).

La **hipermetilación** del DNA es una característica común de las células de los tejidos cancerosos. Cada vez hay más datos en favor de la metilación de los genes que codifican proteínas que dirigen las células que se dividen de manera anormal hacia la muerte celular programada (apoptosis). Por el contrario, en las células de mamífero totipotentes y pluripotentes, como los óvulos fertilizados y las células de los embriones muy jóvenes, el DNA experimenta una desmetilación generalizada.

8.8 | EL COMPLEJO DE PREINICIACIÓN EN LOS EUCARIOTAS: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, RNA POLIMERASA II Y DNA

En contraste con la RNA polimerasa bacteriana, la RNA polimerasa II eucariótica no se une específicamente a los promotores eucarióticos. Un complejo de iniciación se forma, en cambio, mediante un contacto inicial del promotor con el **factor general de transcripción TFIID**. TFIID es uno de los al menos seis factores generales de transcripción (**TFIIA**, **TFIIB**, TFIID, **TFIIE**, **TFIIF** y **TFIIH**) que hacen falta para la transcripción basal por la RNA polimerasa II. La nomenclatura de estos factores de transcripción (TF) responde al hecho que están implicadas en la formación del complejo de preiniciación de la RNA polimerasa II (Tabla 8.1).

TFIID es un complejo formado por múltiples subunidades que contiene la proteína TBP (proteína de unión a TATA) y varios TAF diferentes (factores asociados a TBP). El contacto del TFIID con el DNA está mediado por la unión del TBP al surco menor del DNA, en una secuencia consenso denominada caja TATA, que se en-

TABLA 8.1 Factores de transcripción generales encontrados en los eucariotas

Factor	*Número de subunidades*	*Masa (kDa)*
TFIID		
TBP	1	38
TAF	12	15–250
TF1IA	3	12, 19, 35
TFIIB	1	15
TFIIE	2	34, 57
TFIIF	2	30, 74
TFIIH	9	35–89

Origen: Roeder, R. G. *Trends Biochem. Sci.* 21: 329, 1996.

cuentra 27 pb más arriba del inicio de transcripción. La caja TATA debe ser accesible al TFIID; por tanto, como se ha mencionado anteriormente, no puede encontrarse en la cara interna del nucleosoma para que sea posible la formación del complejo de preiniciación. La interacción del TBP con el DNA causa una profunda distorsión del dúplex del DNA (Figura 8.21). Se creía que TBP era insustituible en la transcripción de todos los genes de la RNA polimerasa, pero la identificación reciente del TLF (factor semejante al TBP) sugiere que en algunos genes otra proteína realiza la misma función. La unión de TBP a la caja TATA dirige la formación del complejo de preiniciación por adición ordenada de varios factores generales de transcripción y la RNA polimerasa II (Figura 8.22). Como se ha mencionado anterior-

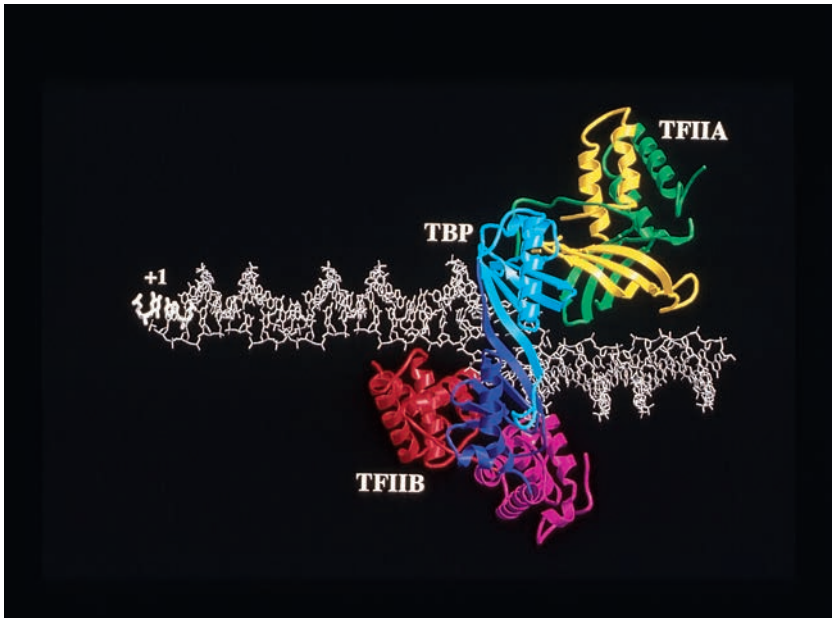


FIGURA 8.21
La proteína de unión a la caja TATA (TBP) ha sido cocristalizada con DNA.
El primer paso en la formación del complejo de transcripción, que llevará a cabo la transcripción génica mediada por la RNA polimerasa II, es la asociación del factor de transcripción general TFIID con el DNA. En la mayor parte de casos, la interacción está facilitada por una proteína del complejo proteico del TFIID, la TBP, que se une al DNA a través de contactos con la secuencia TATA. La cocristalización de TBP con el DNA permite la observación de los detalles de la interacción y muestra que la unión de TBP introduce una curvatura significativa en el DNA. En la figura se muestran otros dos factores de transcripción generales, TFIIA y TFIIB, ninguno de los cuales está implicado en los contactos iniciales con el DNA. TFIIA se une a TBP y estabiliza la interacción TBP-DNA. TFIIB se une a TBP e induce el reclutamiento de la RNA polimerasa II en el complejo en crecimiento y está implicado en la identificación del sitio de inicio de la transcripción. Véase la Figura 9.27, p. 391, para otra vista de la proteína de unión a TATA.
Reproducido de Voet, D., Voet, J., y Pratt, C. W. Fundamentals of Biochemistry. *New York: Wiley, 1999. Reproducido con permiso de John Wiley and Sons Inc. Figura cortesía de S. K. Burley y D. B. Nikolova, Rockefeller University.*

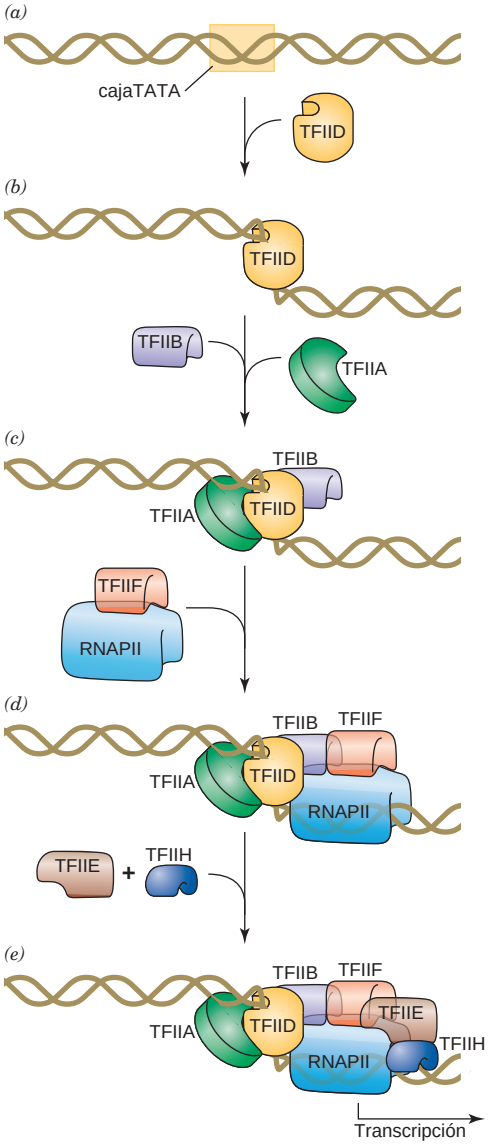


FIGURA 8.22
La formación del complejo de iniciación en los genes transcritos por la RNA polimerasa II sigue una secuencia ordenada.
Muchos de los modelos actuales de la formación del complejo de iniciación incluyen las siguientes etapas. (*a*) La región promotora de un gen con caja TATA antes de la unión de TFIID. (*b*) TFIID, que incluye TBP, se une a la caja TATA y curva el DNA. (*c*) El complejo DNA-TFIID sirve de sitio de coordinación para la unión de otros factores de transcripción generales. El complejo de TFIID se asocia con TFIIA y TFIIB. TFIIA sirve para estabilizar la interacción TFIID-DNA y TFIIB suministra un lugar apropiado para la unión de la RNA polimerasa II. (*d*) TFIIF y la RNA polimerasa II se unen al complejo. En este punto el dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II no está fosforilado. Se cree que TFIIF desestabiliza interacciones no específicas entre la RNA polimerasa II y el DNA, dirigiendo así la RNA polimerasa II hacia el complejo de iniciación en crecimiento. (*e*) Dos factores de transcripción generales adicionales se unen al complejo. TFIIE recluta TFIIH para el complejo. TFIIH tiene actividad helicasa, ATPasa y quinasa. Se cree que TFIIH tiene papeles en la apertura transitoria del DNA necesaria para suministrar un molde de DNA de cadena sencilla a la RNA polimerasa II, y también en la fosforilación del CTD de la RNA polimerasa II, que es necesaria para que la polimerasa pueda abandonar el complejo de iniciación y proceder a la transcripción.
Modificado de Voet, D., Voet, J., y Pratt, C. W. Fundamentals of Biochemistry. *New York: Wiley, 1999.*

mente, la subunidad mayor de la RNA polimerasa II tiene la secuencia repetitiva PTSPSYS en el dominio C-terminal (CTD). La incorporación de la RNA polimerasa II al complejo de preiniciación sólo ocurre cuando su CTD no está fosforilado. Sin embargo, el movimiento de alejamiento de la RNA polimerasa II del sitio de formación se correlaciona con la fosforilación del CTD. Por lo tanto, la formación del complejo de preiniciación no es suficiente para asegurar la transcripción; son necesarias señales adicionales, como la fosforilación, para que empiece la transcripción.

La formación del complejo de preiniciación permite que la actividad **helicasa** dependiente de ATP asociada con el TFIIH abra las dos hebras del DNA para generar un molde para la posterior fase de elongación de la síntesis de RNA. El TFIID permanece atrás, todavía unido a la caja TATA, para promover la formación de complejos de preiniciación adicionales. El TFIIF continúa unido a la DNA polimerasa II durante la fase de elongación, pero los otros factores de transcripción generales se disocian del complejo de elongación.

El promotor y otras secuencias que influyen en la transcripción eucariótica

Los promotores de los genes eucarióticos transcritos por la RNA polimerasa II se definen operacionalmente como aquellas secuencias que influyen en la iniciación de la transcripción génica. La característica más sobresaliente de los promotores eucarióticos es la utilización de múltiples sitios de unión de factores de transcripción para regular la actividad génica. En general, estos sitios de unión se encuentran relativamente cerca de la **caja TATA** que marca el sitio de formación del complejo de preiniciación. En los promotores eucarióticos, a menudo se encuentran otras secuencias consenso, tales como las cajas **CAAT** y **GC** (la caja GC se refiere a la secuencia consenso GGGCGG) (Figura 8.23). La posición exacta de la caja CAAT y la orientación y número de cajas GC varían con el promotor. Estas secuencias (como la caja TATA) están presentes en la mayoría, pero no en todos los promotores. La caja CAAT sirve de sitio de unión de diferentes factores de transcripción, incluido NF1. Las múltiples cajas GC suministran múltiples sitios de unión para el factor de transcripción SP1. La presencia de una caja CAAT se considera como un indicador de un promotor fuerte, y la caja GC es característica de muchos genes constitutivos.

La unión de factores de transcripción a otras secuencias de los promotores está influida por la presencia de moléculas de señalización, tales como las hormonas asociadas con los factores de transcripción de respuesta a los esteroides, o por la fosforilación de las cadenas laterales de aminoácidos. Las secuencias de DNA a las que se unen este tipo de factores de transcripción se denominan habitualmente **elementos de respuesta**. Además, los sitios de unión en los promotores de algunos genes son usados por factores de transcripción exclusivos de tejidos específicos o que aparecen en momentos determinados del desarrollo. La efectividad relativa de las secuencias reguladoras encontradas en los promotores depende de su orientación o direccionalidad y puede disminuir al modificar su distancia de la caja TATA.

El **potenciador** es una secuencia reguladora adicional asociada a muchos genomas eucarióticos celulares y víricos. Los elementos potenciadores también constituyen sitios de unión de proteínas específicas que regulan la transcripción. Sin embargo, difieren de las secuencias promotoras en dos aspectos importantes. Primero, los potenciadores pueden estar alejados miles de pares de bases del sitio de formación del complejo de preiniciación y pueden encontrarse tanto más arriba como más abajo del sitio de iniciación de la transcripción. Segundo, el elemento potenciador puede actuar en ambas orientaciones. La existencia de elementos potencia-

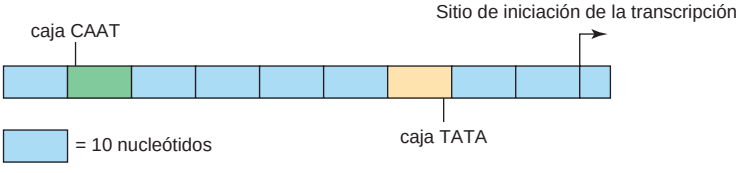


FIGURA 8.23
Las secuencias de DNA de los genes transcritos en los eucariotas habitualmente contienen una caja TATA y pueden contener una caja CAAT, regiones ricas en GC (cajas GC) y múltiples sitios de unión para factores de transcripción que no se muestran.

dores ilustra las restricciones espaciales que actúan sobre los factores de transcripción que se unen al DNA y coordinan la interacción con el complejo de preiniciación que afecta al inicio de la transcripción. Los factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta cercanos al sitio de iniciación de la transcripción pueden actuar directamente sobre el complejo de iniciación o a través de proteínas que hacen las veces de puente. La presencia de proteínas con función de puente que influyen sobre la transcripción es frecuente. Sin embargo, en el caso de los elementos potenciadores, la distancia lineal entre el potenciador y el complejo de preiniciación puede ser muy grande. Los factores de transcripción unidos a elementos potenciadores entran en contacto con el complejo de preiniciación mediante la formación de un bucle en el DNA que aproxima elementos muy separados en el DNA lineal. Esta flexibilidad también contribuye a explicar por qué los potenciadores actúan a distancia y por qué la orientación de la secuencia del potenciador carece de importancia. Siempre que la proteína se una al potenciador, el alineamiento de la proteína con el complejo de preiniciación puede ajustarse gracias al lazo del DNA.

Diseño modular de los factores de transcripción eucarióticos

Los factores de transcripción eucarióticos poseen múltiples dominios implicados en interacciones específicas. Entre estos dominios se encuentran dominios de reconocimiento del DNA, que participan en la unión específica de sitio, y dominios de activación que entran en contacto con factores de transcripción generales, la RNA polimerasa II u otros reguladores de la transcripción. Otros dominios presentes en muchos factores de transcripción son los dominios de dimerización que promueven la formación de homodímeros o heterodímeros con otros factores de transcripción monoméricos y dominios de interacción con proteínas que permiten la asociación con otras proteínas como la acetilasa de histonas. Además, muchos factores de transcripción tienen dominios que se unen a coactivadores. Algunos ejemplos de coactivadores son las hormonas esteroides y el cAMP, que cuando están unidos modifican la capacidad del factor de transcripción para unirse al DNA o actuar como activador. A pesar de que la secuencia de aminoácidos y la composición identifican unívocamente cada factor de transcripción, los dominios implicados en cada actividad pueden ser agrupados en unos pocos motivos característicos.

Motivos comunes en las proteínas que interaccionan con el DNA y regulan la transcripción

En los factores de transcripción se encuentran a menudo varios **motivos aminoacídicos** característicos. Entre ellos se encuentran los dominios hélice-giro-hélice (HTH), dedos de zinc, hélice-lazo-hélice (HLH) y región básica-cremallera de leucina (bZIP) (véase p. 387). Estos motivos representan el 80% de las proteínas conocidas de unión a secuencia específica del DNA.

Entre las proteínas con el motivo **hélice-giro-hélice** (HTH) se encuentran el represor lactosa de *E. coli* (véase la Sección 8.3) y un grupo de factores de transcripción con un importante papel en el desarrollo, las denominadas **proteínas con homeodominio**. El homeodominio es la porción encargada del reconocimiento del DNA de estos factores de transcripción. Recibió este nombre porque es característico de las proteínas necesarias para la especificación de los segmentos durante el desarrollo de la mosca de la fruta. Las mutaciones de los genes que codifican estas proteínas provocan homeosis, en la cual, por ejemplo, la identidad de las antenas durante el desarrollo puede verse alterada, con el resultado de que aparezcan patas en el lugar donde debería haber antenas. Los proteínas con homeodominio han resultado ser también reguladores clave durante el desarrollo en los mamíferos. El motivo HTH tiene unos 20 aminoácidos y es, pues, una parte relativamente pequeña de una proteína mucho mayor. Es el dominio dentro de la proteína el responsable de la interacción con el DNA específica de secuencia. Los primeros siete aminoácidos del dominio forman una hélice seguidos por un giro de cuatro aminoácidos y a continuación por una hélice de nueve aminoácidos. La hélice de nueve aminoácidos es la "hélice de reconocimiento" que se une al surco mayor con especificidad de secuencia, mientras que las interacciones hidrofóbicas entre la hélice de siete residuos y un lado de la hélice de nueve residuos estabilizan la estructura. El resto de la proteína puede tener sitios alostéricos que pueden ser ocupados por reguladores de la estructura o regiones que permitan otras interacciones proteína-proteína (Figura 8.24 y p. 387).

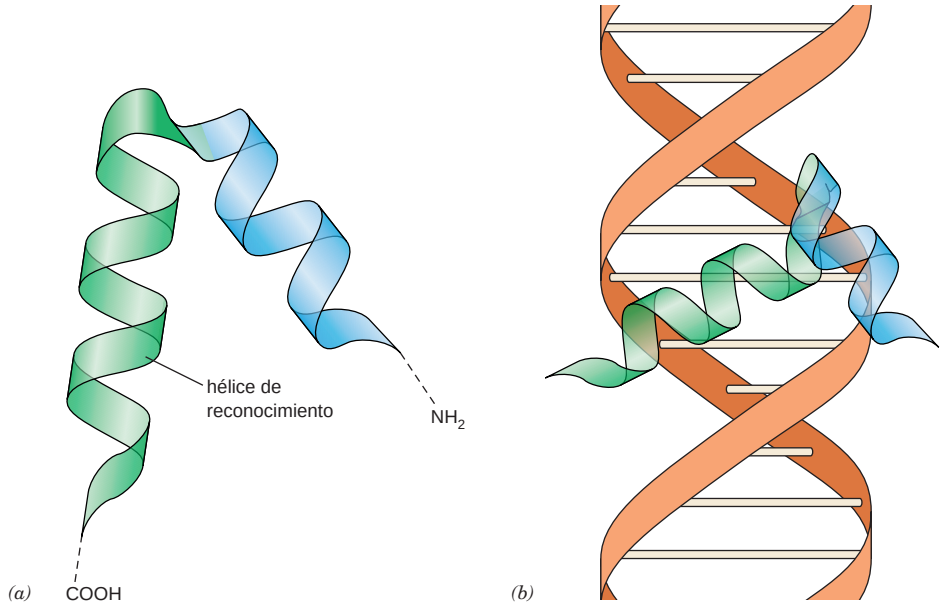


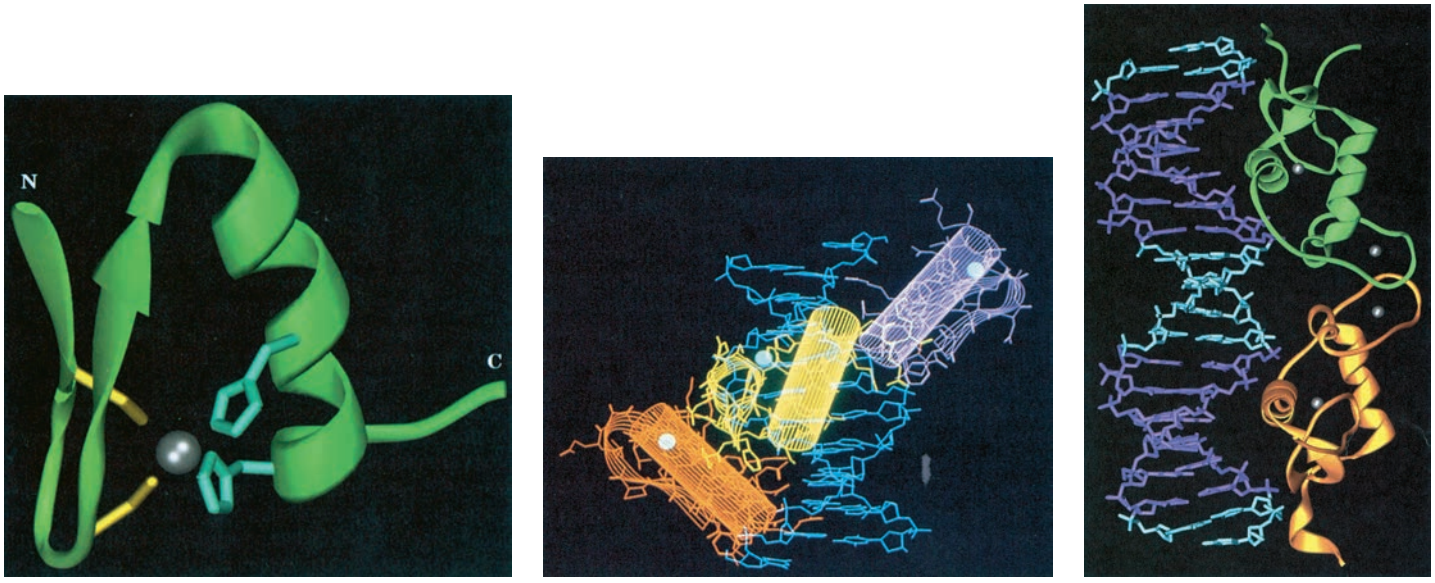
FIGURA 8.24
Las proteína con el motivo hélice-giro-hélice usan una hélice para unirse al surco mayor mientras la otra estabiliza la unión mediante interacciones hidrofóbicas.
(*a*) El dominio HTH tiene habitualmente unos 20 aminoácidos que forman dos hélices α individuales unidas por un giro no helicoidal. (*b*) Las dimensiones de la hélice α permiten que ésta encaje en el surco mayor de la hélice del DNA. La hélice (verde) que interacciona directamente con el DNA (la hélice de reconocimiento) posee unos nueve aminoácidos con cadenas laterales que pueden establecer puentes de hidrógeno con bases específicas en el surco mayor. La segunda hélice (azul) del motivo HTH no interacciona directamente con el DNA, pero estabiliza la unión de la hélice de reconocimiento mediante interacciones hidrofóbicas. Por lo tanto, ambas hélices contienen aminoácidos como la valina y la leucina que hacen posibles estas interacciones.

Modificado de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. Molecular Biology of the Cell. *New York: Garland Publishing, 1994.*

Los ejemplos de proteínas con **dedos de zinc** incluyen el factor de transcripción general TFIIIA, que se une a los promotores de los genes transcritos por la RNA polimerasa III, el Sp1 (que da lugar a una estimulación entre 10 y 20 veces de los genes con cajas GC), Gal4 de levadura y la superfamilia de receptores de hormonas esteroides. Se distinguen diferentes subclases de proteínas con dedos de zinc según el aminoácido que coordina la unión del Zn. Por ejemplo, en el TFIIIA la unión del Zn está coordinada por dos Cys y dos His y pertenece a la clase C2H2, mientras que los receptores de hormonas esteroides utilizan cuatro Cys y son de la clase C_x. El dedo de zinc se une al surco mayor del DNA con especificidad de secuencia, mediante una hélice α de uno de los lados de la región del dedo. Como hemos visto en el caso de las proteínas HLH, la capacidad de una hélice α para encajar en el surco mayor con las cadenas laterales de los aminoácidos formando puentes de hidrógeno con las bases en el surco mayor explica la unión específica de secuencia (véase la p. 388).

Las características de las dos clases de proteínas con dedos de zinc están relacionadas con la manera como cada clase se posiciona sobre el DNA. En el TFIIIA, los sucesivos dedos de zinc siguen el surco mayor, cada uno formando puentes de hidrógeno con bases específicas. Las proteínas con dedos de zinc de la clase C_x, como los factores de transcripción de los receptores de hormonas esteroides, utilizan un dedo de zinc para unirse al DNA y un segundo dedo de una manera que recuerda a las proteínas HTH. El segundo dedo de zinc estabiliza la unión del primer dedo mediante una interacción proteína-proteína. Los factores de transcripción de los receptores de hormonas esteroides se asocian al DNA en forma de dímero, y, de acuerdo con esta característica, el sitio de unión tiene dos mitades palindrómicas espaciadas adecuadamente para acomodar los dos dedos de unión al DNA formados en la dimerización (Figura 8.25).

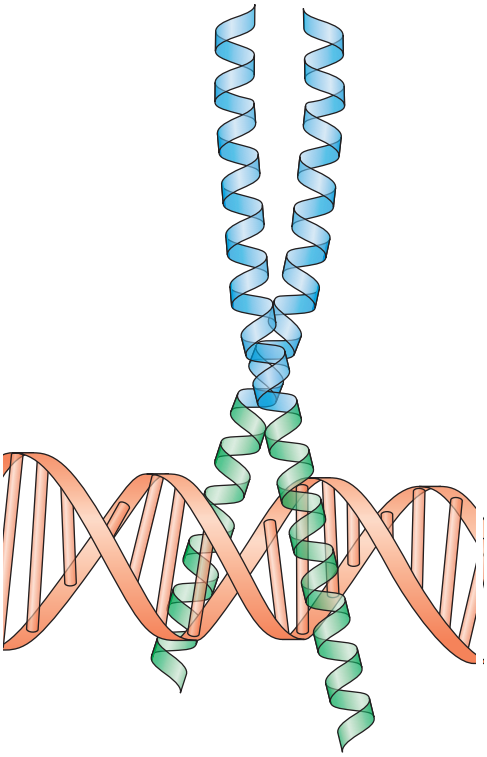
Entre los ejemplos de proteínas con región básica-**cremallera de leucina** (bZIP) se encuentran fos, jun y CREB. Las proteínas bZIP se nombran en referencia a la repetición periódica de los residuos de leucina en una hélice α. Estas leucinas forman interacciones hidrofóbicas con una segunda proteína en la cual una hélice similar permite la formación de un dímero. Por lo tanto, la cremallera de leucina se



(a) *(b)* *(c)*

FIGURA 8.25
Se encuentran dos motivos diferentes de dedo de zinc en los factores de transcripción.
Aunque ambas proteínas con dedos de zinc usan la coordinación del Zn para adquirir su estructura final, las estructuras de sus motivos son claramente diferentes. (*a*) Ambas clases aprovechan la estructura en hélice α para formar dominios que se unen al surco mayor del DNA. Tanto dos cisteínas y dos histidinas como cuatro o más cisteínas pueden coordinar la unión del Zn. (*b*) La clase C2H2 comprende proteínas que pueden tener muchos dominios en dedo de zinc. Cada hélice α de un dedo de zinc puede potencialmente unirse con especificidad de secuencia al surco mayor. El resultado es una serie de interacciones proteína-DNA, cada una dependiente de la secuencia concreta de cadenas laterales en cada uno de los dominios α helicoidales de la proteína con dedos de zinc. (*c*) La clase C_x de proteínas con dedo de zinc normalmente posee dos dominios en dedo de zinc. La hélice α de un dedo de zinc se une al DNA en el surco mayor, mientras que la hélice α del otro dedo de zinc estabiliza la unión mediante interacciones hidrofóbicas con el dominio de unión al DNA. La clase C_x de proteínas con dedos de zinc normalmente se une al DNA en forma de dímeros. Se ilustra la interacción del dímero del receptor de los glucocorticoides, con los contactos de cada monómero con el DNA. Los átomos de Zn están representados por esferas.

Reproducido de Voet, D. y Voet, J. G., Biochemistry, 2nd ed., New York: Wiley, 1995. Reproducido con permiso de John Wiley and Sons Inc. Parte (b) cortesía de C. Pabo, MIT.



refiere al dominio de interacción proteína-proteína. El dímero formado puede ser un homodímero o un heterodímero (Figura 8.26 y p. 389).

La superficie de contacto de la proteína con el DNA es una región básica con alto contenido de arginina y lisina. La región básica está formada por dos hélices α con un ligero cambio en un punto de la dirección del eje helicoidal, que facilita el seguimiento del surco mayor del DNA. Los aminoácidos básicos sirven para estabilizar la asociación DNA-proteína a través de interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados positivamente y el DNA cargado negativamente. El lugar de unión del DNA es diferente cuando la proteína bZIP actúa como un homodímero que cuando actúa como un heterodímero. Los homodímeros se unen a un sitio con simetría binaria, mientras que no se encuentra esta simetría en los sitios de unión de los heterodímeros.

FIGURA 8.26
Las proteínas con cremalleras de leucina se unen al DNA como dímeros.
Las proteínas con cremalleras de leucina forman dímeros gracias a la disposición periódica de leucinas a lo largo de un dominio en hélice α. Las leucinas forman una cara hidrofóbica que interaccionará con la cara hidrofóbica de una proteína con un hélice α con leucinas situadas de forma similar. Los dominios de interacción proteína-proteína se muestran en azul. Las regiones en hélice α pueden continuar más allá del dominio de interacción proteína-proteína, para permitir la unión al surco mayor del DNA (verde). En los homodímeros, el sitio de interacción con el DNA tiene dos mitades simétricas fácilmente reconocibles.
Modificado de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. Molecular Biology of the Cell. *New York: Garland Publishing, 1994.*

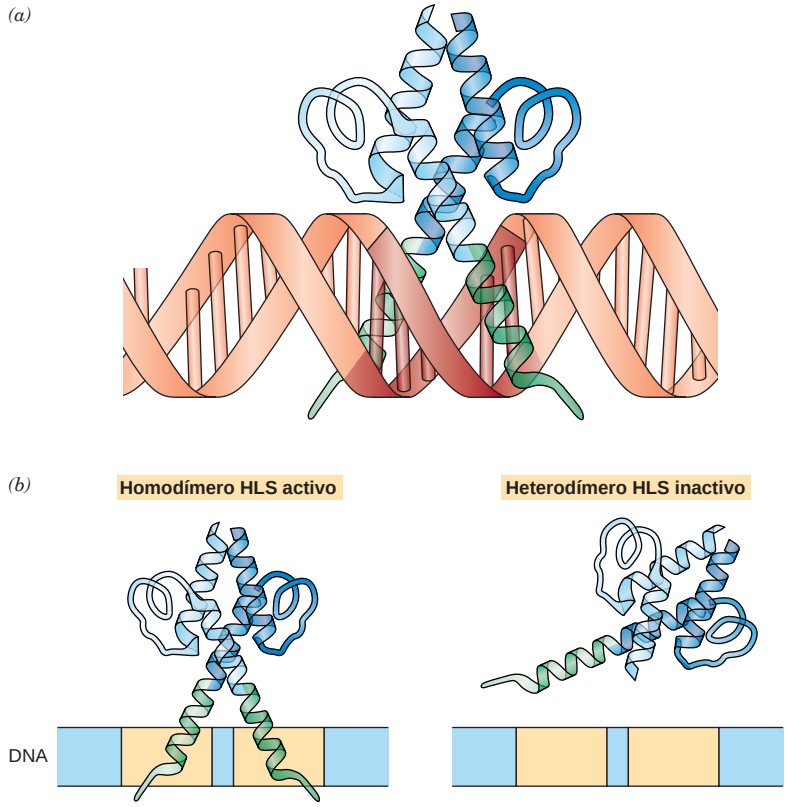


FIGURA 8.27
La formación de los dímeros en los factores de transcripción está mediada por interacciones hélice-lazo-hélice.
El motivo hélice-lazo-hélice aproxima dos monómeros para formar un dímero que se une al DNA. (*a*) Cada monómero tiene dos hélices unidas por un lazo. Una hélice (azul) se usa en la interacción proteína-proteína; la otra (verde) se usa en interacción con el surco mayor del DNA. Por lo tanto, el dímero consiste en un haz de cuatro hélices. Si el dímero se forma a partir de dos monómeros idénticos, los lugares de unión al DNA serán muy parecidos o idénticos; sin embargo, si los monómeros son proteínas diferentes (que forman heterodímeros), los lugares de unión al DNA pueden ser distintos. (*b*) Cuando los factores de transcripción se unen en forma de dímero, la presencia de un monómero truncado puede impedir la unión al DNA incluso en presencia de un monómero completo. Por ejemplo, si la hélice de dimerización no está acompañada del dominio de unión al DNA, la dimerización con un monómero completo da lugar a un producto incapaz de unirse eficazmente al DNA.
Modificado de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J., Molecular Biology of the Cell. *New York: Garland Publishing, 1994.*

La clase de factores de transcripción **hélice-lazo-hélice** incluye myoD, myc y max. Las proteínas hélice-lazo-hélice se caracterizan por dos segmentos helicoidales anfipáticos separados por un lazo. Las hélices no están implicadas en la unión al DNA, como es el caso de las proteínas con dedos de zinc, sino en la dimerización con otra proteína. Como en el caso de las proteína bZIP, los dímeros pueden ser homo- o heterodímeros. Los dominios de unión al DNA son la prolongación de las hélices implicadas en la dimerización (Figura 8.27).

Las estructuras de las proteínas con los motivos hélice-giro-hélice, dedos de zinc, bZIP y hélice-lazo-hélice se describen en detalle en la Sección 9.4, proteínas de unión al DNA (p. 387).

8.9 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EUCARIÓTICA

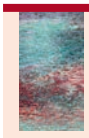
Como se ha indicado anteriormente, la región implicada en la unión específica de secuencia del DNA puede ser relativamente pequeña, mientras que otros dominios están implicados en interacciones proteína-proteína o con ligandos. Se han identificado varios dominios de activación característicos, entre los cuales, dominios acídicos con

una elevada concentración de aminoácidos con cadenas laterales acídicas, dominios ricos en glutamina, y dominios ricos en prolina. La sobreproducción experimental de cualquiera de estos dominios por técnicas de DNA recombinante, incluso sin los correspondientes dominios de unión al DNA, puede provocar la activación extemporánea de la transcripción de diversos genes. Estos dominios activan la transcripción, aumentando la tasa de formación del complejo de preiniciación. Algunos actúan por interacción directa con TFIID, que mejora la unión a la caja TATA, mientras que otros interaccionan con TFIIB o TAF, que son parte del complejo TFIID. Por lo tanto, la unión de múltiples factores de transcripción a un promotor puede tener un efecto combinatorio en la unión y la formación del complejo de preiniciación. Una observación importante es que los dominios de activación de muchos factores de transcripción ejercen su efecto regulador sobre las mismas proteínas del complejo de preiniciación. Por lo tanto, para muchos factores de transcripción la interacción específica con un gen está determinada por la disposición de los sitios de unión en el DNA y no por interacciones proteína-proteína exclusivas de un gen específico.

Un segundo procedimiento mediante el cual los factores de transcripción pueden regular la expresión génica es el reclutamiento de proteínas en la región promotora. Estas proteínas pueden no unirse al DNA, pero pueden formar un puente regulador entre el factor de transcripción unido al DNA y el complejo de iniciación. Alternativamente, la proteína que interacciona puede reclutar enzimas de modificación de la cromatina, como la histona acetilasa (p. ej., el complejo CBP/p300), en genes específicos. La acetilación de las histonas relaja la estructura de la cromatina. Algunos factores de transcripción regulados que reclutan el complejo CBP/p300, y las moléculas o situaciones a las que responden, son CREB y cAMP, SPEBP y colesterol, NF-κB y citoquinas, y p53 y detención del crecimiento. Se han encontrado pocos factores de transcripción que reduzcan la expresión génica. Pueden actuar de diferentes formas. Un factor negativo puede unirse previamente al DNA, tanto específicamente en el sitio de un factor positivo o, más globalmente, como en el efecto negativo de las proteínas de unión a DNA metilado. Alternativamente, los factores negativos pueden inhibir la unión o la formación del complejo de preiniciación. Finalmente, los factores negativos pueden unirse a un factor de transcripción positivo, impidiendo su unión al DNA o acelerando su degradación.

Regulación de los reguladores

Los propios factores de transcripción son regulados de múltiples formas. Probablemente los ejemplos más sencillos son los factores que son sintetizados solamente por ciertas células o en momentos específicos del desarrollo. La presencia o ausencia del factor de transcripción determina la actividad. Algunos factores están regulados por unión de cofactores, que pueden tanto inhibir como estimular la unión al DNA. En los factores de transcripción que se unen como dímeros o multímeros, la formación de complejos homo- o heterodiméricos no productivos puede alterar la unión al DNA y las interacciones proteína-proteína que permiten la activación génica. Las modificaciones postraducción, tales como la maduración de las proteínas o la fosforilación, pueden afectar no sólo la capacidad de los factores de transcripción para unirse al DNA o a otras proteínas, sino también su capacidad para trasladarse del citoplasma al núcleo (véasne las Aplis. Clíns. 8.3 y 8.4).



APLICACIÓN CLÍNICA 8.3

Unión del tamoxifeno a los receptores de los estrógenos

El tamoxifeno, un fármaco usado en el tratamiento del cáncer de mama, se une a los receptores de los estrógenos (ER) en lugar del estrógeno. Puesto que el estrógeno activa al receptor de los estrógenos, el tamoxifeno reduce la transcripción de los genes que están regulados por el receptor de los estrógenos y, por tanto, reduce el crecimiento de las células del cáncer de mama. Sin embargo, hay un inconveniente, pues a veces el tratamiento con tamoxifeno aumenta el riesgo de cáncer de útero. Aparentemente, la causa se debe a la presencia de dos subtipos del receptor de los estrógenos (α y β). Ambos subtipos se encuentran en el tejido mamario, pero el receptor α predomina en el útero. Cuando el tamoxifeno se une al receptor α, da lugar a la activación, en lugar de la inhibición, de la transcripción, en conjunción con los factores fos y jun.

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G., Nilsson, S., Gustafsson, J.-A., Kushner, P. J., y Scanlan, T. S. Differential ligand activation of estrogen receptors ERα and ERβ at AP1 sites. *Science* 277:1508, 1997.

La activación de la transcripción del gen del receptor de las LDL ilustra muchas de las características encontradas en la regulación génica eucariótica

La descripción de la regulación de la expresión de genes eucarióticos específicos puede ser significativa para los especialistas, pero suele resultar confusa para la mayoría. Muchas de las características de los factores de transcripción descritas anteriormente son ilustradas por el control transcripcional del gen del **receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)**. Este gen se transcribe como respuesta a la falta de colesterol celular. El aumento de la transcripción del gen causa un aumento de la proteína receptora de LDL y a una mejor captación de las LDL y de su colesterol en la sangre (véase la p. 745).

El promotor del gen del receptor de las LDL tiene una caja TATA y varias regiones que son lugares de unión de factores de transcripción conocidos (Figura 8.28). La caja TATA es el lugar de unión de TFIID y de formación del complejo de preiniciación con la RNA polimerasa II. También hay tres sitios consenso en los cuales puede unirse el factor con dedos de zinc Sp1 (recuérdese que el Sp1 se une a las cajas GC de los promotores). La proteína modular Sp1 tiene, además del motivo del dedo de zinc, un dominio de activación rico en glutamina, que se cree ayuda al reclutamiento de TFIID por la caja TATA. Para el reclutamiento se utiliza un factor adicional, el cofactor necesario para la activación de Sp1 (CRSP). Sin embargo, la unión de Sp1 no es suficiente para activar la transcripción del gen cuando éste se encuentra organizado como cromatina. La activación también requiere la participación de un segundo factor de transcripción denominado **SREBP-1a** (proteína 1a de unión al elemento de respuesta al esterol). SREBP-1a es un factor de transcripción del tipo hélice-lazo-hélice-cremallera de leucinas que se une a la secuencia del elemento de respuesta a los esteroles que se encuentra entre los sitios de unión de Sp1 en el gen del receptor de las LDL.

El transporte de SREBP-1a al interior del núcleo hace posible que la célula responda a la concentración de colesterol. La SREBP-1a contiene dos dominios que forman un lazo a través de la membrana del retículo endoplasmático (RE), con los dominios susceptibles de actuar de factor de transcripción expuestos al citoplasma, pero anclados en el RE. Para que el SREBP-1a se desplace al núcleo debe sufrir dos cortes proteolíticos, el primero corre a cargo de una proteasa que se encuentra en forma activa en un compartimiento post-RE, denominado cis-Golgi. El transporte de SREBP-1a hasta el cis-Golgi depende de la interacción con la proteína activadora del corte de SREBP (SCAP), que también se encuentra parcialmente incluida en la membrana del RE. SCAP tiene una región que hace de sensor de colesterol y cuando los niveles de colesterol en las membranas son bajos el complejo SCAP-SREBP-1a es transportado hasta el cis-Golgi, donde tiene lugar la proteólisis de SREBP-1a que libera la porción de la proteína que puede actuar de factor de transcripción en el

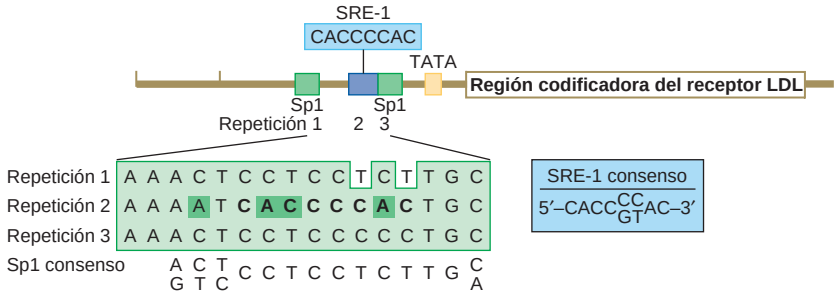
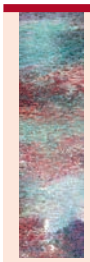


FIGURA 8.28
Esquema del promotor del gen del receptor de las LDL.
El gen del receptor de las LDL tiene la estructura típica de muchos genes eucarióticos con varios sitios de unión de factores de transcripción. Aquí se muestran los sitios principales que están implicados en la regulación del receptor LDL en respuesta a los niveles de colesterol. Entre ellos se encuentran la caja TATA, justo por encima de del sitio de iniciación de la transcripción, varias cajas GC (sitios de unión de Sp1) y el elemento de respuesta a esteroides (SER) donde se une SREBP.
Modificado de Goldstein, J. L. y Brown, M. S. Nature *343:425, 1990.*



APLICACIÓN CLÍNICA 8.4
Factores de transcripción y enfermedades cardiovasculares

Entre los genes recientemente identificados como causantes de enfermedades cardiovasculares se encuentran dos genes que codifican factores de transcripción. Uno de los genes, NKX2-5, codifica una proteína que contiene un homeodominio. Las proteínas con homeodominios son reguladores de la expresión génica durante el desarrollo embrionario, y NKX2-5 regula genes implicados en la formación del corazón. Las mutaciones en uno solo de los alelos de NKX2-5 provoca defectos en el tabique interauricular, la válvula A/V y el sistema de conducción. La mutación nula, hasta ahora sólo identificada en los ratones, es letal para el embrión. El otro gen, Tbx, es responsable del síndrome de Holt-Oram. El síndrome de Holt-Oram produce agujeros entre las aurículas y a veces entre los ventrículos y también deformidades en las manos y los brazos.

Barinaga, M. Tracking down mutations that can stop the heart. *Science* 128:32, 1998; Schott, J. J., Benson, D. W., Basson, C. T., Pease, W., et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 281:108, 1998; y Li, Q. Y., Newbury-Ecob R.A., Terrett, J.A., Wilson, D. I., et al. Holt–Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature Genet.* 15:21, 1997.

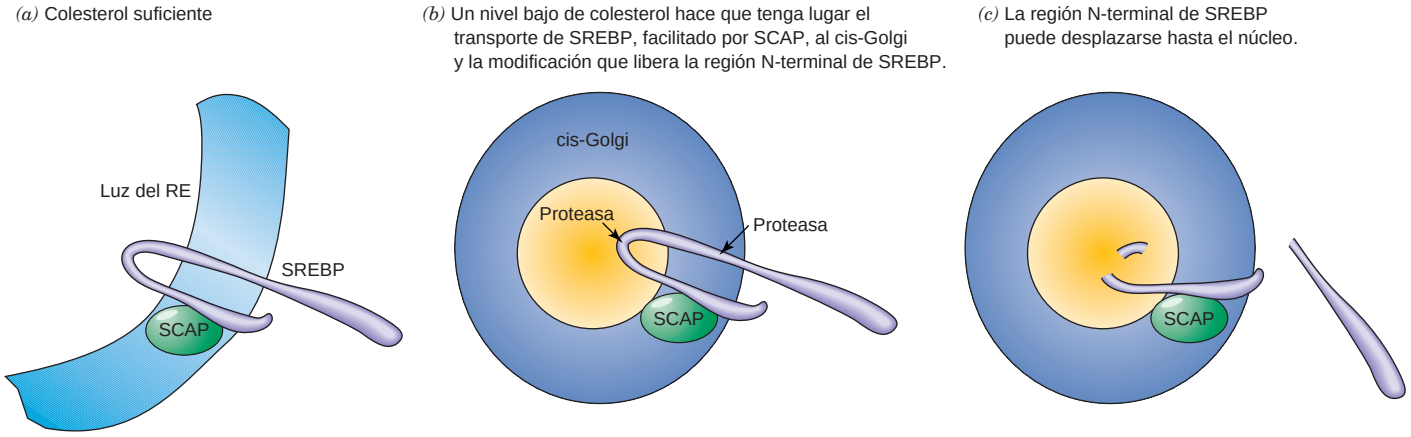


FIGURA 8.29
SREBP es liberado por proteólisis a partir de un precursor unido a membrana.
(*a*) La proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides (SREBP) se sintetiza como una proteína precursora que debe ser modificada por proteólisis antes de poder actuar como factor de transcripción. El precursor está anclado en la membrana del RE por dos regiones que abarcan el espesor de la membrana. Se encuentra estrechamente asociado con la proteína activadora del corte de SREBP (SCAP) pero permanece sin modificar si los niveles de colesterol de la membrana son normales. (*b*) SCAP detecta los niveles bajos de colesterol y se desplaza con SREBP hacia el cis-Golgi donde SREBP es cortada por dos proteasas distintas, (*c*) que permiten que el dominio citoplasmático se desplace hasta el núcleo. De esta forma, SREBP no activa el gen del receptor LDL, a menos que los niveles de colesterol sean bajos.
Adaptado de Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., y Goldstein, J. L. Cell *100:391, 2000.*

núcleo (Figura 8.29). Una vez en el núcleo puede unirse al elemento de respuesta a los esteroides (SRE) en el promotor de la LDL, donde recluta una histona acetiltransferasa denominada CBP, así como otras proteínas. Entonces, y como resultado de la acción de Sp1 y CRSP, el receptor de las LDL se vuelve transcripcionalmente activo (Figura 8.30).

Este ejemplo ilustra la compleja naturaleza de la regulación génica eucariótica, en la cual la activación de los factores de transcripción, la coordinación de múltiples factores de transcripción y el reclutamiento de enzimas de remodelación de la cromatina actúan de manera coordinada para regular la expresión génica.

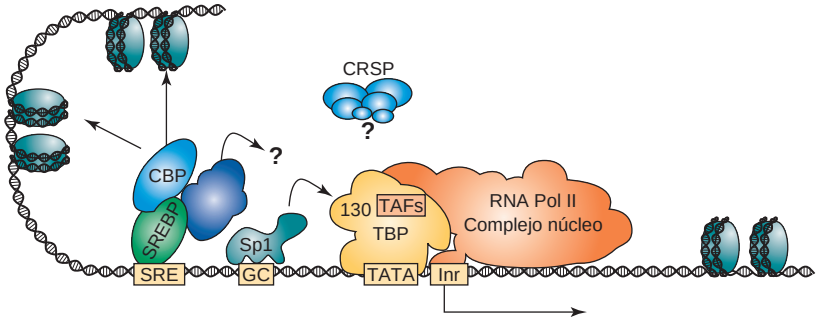


FIGURA 8.30
El gen del receptor de LDL se activa por los efectos coordinados de varios factores de transcripción.
La activación del receptor de LDL requiere la participación de varios factores diferentes. Una vez SREBP, Sp1 y el cofactor requerido para la activación de Sp1 (CRSP) se han unido, la histona acetil transferasa, CBP, es reclutada en el promotor. Una combinación de factores suministra la señal positiva necesaria para potenciar la unión del complejo de iniciación a la caja TATA, y gracias al reclutamiento de CBP también afecta la estructura de la cromatina en el entorno.
Naar, A. M., Ryu, S., y Tijian, R. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *LXIII:189, 1998.*

BIBLIOGRAFÍA

Expresión génica procariótica

Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453, 1997.

Cohen, S. N. y Shapiro, J. A. Transposable genetic elements. *Sci. Am.* 242:40, 1980.

Miller, J. H. The *lac* gene: its role in *lac* operon control and its use as a genetic system. En: J. H. Miller y W. S. Resnikoff (Eds.), *The Operon.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1978, p. 31.

Platt, T. Regulation of gene expression in the tryptophan operon of *Escherichia coli.* En: J. H. Miller y W. S. Resnikoff (Eds.), *The Operon.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1978, p. 263.

Schultz, S.C., Shields, G. C. y Steitz, T. A. Crystal structure of a CAP–DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* 253:1001, 1991.

Expresión génica eucariótica

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Publishing, 1994.

Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. y Goldstein, J. L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391, 2000.

Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L. y Workman, J. L. The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem. Sci.* 25:15, 2000.

Burley, S. K. y Roeder, R. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* 65:769, 1996.

Cramer, P. Bushnell, D. A. y Kornberg, R. D. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. Science 292:1863, 2001.

Dahmus, M. E. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 271:19009, 1996.

Dantonel, J.-C., Wurtz, J.-M., Poch, J. M., Moras, D. y Tora, L. The TBP-like factor: an alternative transcription factor in Metazoa. *Trends Biochem. Sci.* 24: 335, 1999.

Goldstein, J. L. y Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425, 1990.

Harrison, S. C. A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353: 715, 1991.

Kornberg, R. D. Mechanism and regulation of yeast RNA polymerase II transcription. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LXIII: 229, 1998.

Latchman, D. S. *Eukaryotic Transcription Factors,* 3rd ed. New York: Academic Press, 1998.

Lemon, B. y Tjian, R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14:2551, 2000.

Lewin, B. *Genes VII.* New York: Oxford University Press, 2000.

Miller, J., McLachlan, A. D. y Klug, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factorIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4:1609, 1985.

Naar, A. M., Ryu, S. y Tijian, R. Cofactor requirements for transcriptional activation by Sp1. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LXIII:189, 1998.

Ng, H. y Bird, A. Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.* 25:121, 2000.

Orphanides, G., Lagrange, T. y Reinberg, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10:2657, 1996.

Pabo, C. O. y Sauer, R. T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61:1053, 1992.

Pruss, D., Hayes, J. J. y Wolffe, A. Nucleosomal anatomy—where are the histones? *BioEssays* 17:161, 1995.

Roeder, R. G. Role of general and gene-specific cofactors in the regulation of eukaryotic transcription. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LXIII:201, 1998.

Stewart, S. y Crabtree, G. Regulating the regulators. *Nature* 408:46, 2000.

Wolffe, A. P. The cancer–chromatin connection. *Sci. Med.* 6:28, 1999.

Wolffe, A. P. *Chromatin: Structure and Function,* 3rd ed. New York: Academic Press, 1998.

Woychik, N. y Young, R. RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem. Sci.* 15:347, 1990.

Zawel, L. y Reinberg, D. Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:488, 1992.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. La expresión completa del operón *lac* requiere:
   A. lactosa y cAMP.
   B. alolactosa y cAMP.
   C. sólo lactosa.
   D. sólo alolactosa.
   E. el correpresor *lac*.

2. En un operón:
   A. cada gen del operón se transcribe independientemente para conseguir los niveles de expresión necesarios para la célula.
   B. el control puede ejercerse por medio de la inducción o por medio de la represión.
   C. operador y promotor pueden estar en trans respecto los genes que regulan.
   D. los genes estructurales o no se expresan en absoluto o se expresan completamente.
   E. el control de la expresión génica consiste exclusivamente en la inducción y la represión.

3. La región *lac*ZYA de *E. coli* se estimulará si:
   A. hay un defecto en la fijación del inductor al producto del gen *lac*I.
   B. tanto glucosa como lactosa se encuentran presentes en el medio, pero hay un defecto en la capacidad de la célula para unir la proteína CAP.
   C. tanto glucosa como lactosa son fácilmente disponibles en el medio.
   D. el operador ha mutado, por lo que no puede unirse al represor.
   E. el correpresor *lac* está ausente.

4. Todas las características siguientes son propias de un operón EXCEPTO:
   A. es un mecanismo de control para genes eucarióticos.
   B. incluye genes estructurales.
   C. se espera que codifique un mRNA policistrónico.
   D. contiene secuencias de control tales como un operador.
   E. puede tener múltiples promotores.

Los siguientes términos se refieren a las preguntas 5–8:

   A. represión.
   B. correpresión.
   C. atenuación.
   D. respuesta estricta.

5. Asociado con la guanosina tetrafosfato y la guanosina pentafosfato.
6. Inhibición de la transcripción por un complejo entre la proteína y una pequeña molécula.
7. Participa un péptido conductor que contiene el mismo aminoácido varias veces repetido.
8. El mecanismo de regulación primario del operón *his*.

9. En la transcripción eucariótica por la RNA polimerasa II, la formación de un complejo de preiniciación:
   A. empieza con la unión de una proteína (TBP) a la caja TATA del promotor.
   B. implica la adición ordenada de varios factores de transcripción y de RNA polimerasa.
   C. permite la apertura dependiente de ATP de las dos hebras del DNA.
   D. requiere que el dominio C-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II no esté fosforilado en este punto.
   E. todas las anteriores son correctas.

10. Los potenciadores:
   A. son secuencias en el promotor que se unen a complejos hormona-factor de transcripción.
   B. son más efectivos cuanto más cerca se encuentran de la caja TATA.
   C. son secuencias de DNA a las que se unen factores de transcripción, pero pueden encontrarse a miles de pares de bases del sitio de formación del complejo de preiniciación.
   D. deben encontrarse más arriba del sitio de formación del complejo de preiniciación.
   E. se unen a factores de transcripción que actúan directamente sobre el complejo de iniciación.

Preguntas 11 y 12: La adquisición de resistencia a un gran número de antibióticos por las bacterias patógenas es un grave problema de salud pública. Una cepa bacteriana que está siendo tratada con un antibiótico puede volverse resistente bruscamente no sólo a este antibiótico sino también a otros, a los que no ha estado expuesta. Esto ocurre cuando la bacteria adquiere de otra cepa un plásmido que contiene varios transposones diferentes.

11. Todas las frases siguientes describen a los transposones EXCEPTO:
   A. son un medio para la incorporación de genes de resistencia a antibióticos en un cromosoma bacteriano.
   B. contienen secuencias terminales cortas de repetición invertida.
   C. codifican un enzima que sintetiza guanosina tetrafosfato y guanosina pentafosfato, que inhiben la posterior transposición.
   D. poseen al menos un gen que codifica una transposasa.
   E. contienen un número variable de genes, desde dos hasta varios.

12. En el funcionamiento de los transposones:
   A. el modo de acción habitual consiste en la eliminación física del transposón del sitio original y su reinstalación en un sitio diferente.
   B. un transposón duplicado debe insertarse en la misma molécula de DNA que la original.
   C. todos los transposones tienen aproximadamente el mismo tamaño.
   D. los sitios de inserción deben encontrarse en una secuencia consenso.
   E. la transposasa puede reconocer los extremos repetitivos del transposón y participar en el corte del sitio receptor.

Preguntas 13 y 14: Los genes que se encuentran en una región heterocromática altamente condensada del DNA no pueden ser transcritos. Para ser transcritos, esta región debe descondensarse, lo que puede producirse por acetilación de las histonas. Uno de los enzimas responsables de la acetilación de las histonas es una acetiltransferasa denominada CBP, o proteína de unión a CREB. CREB es un factor de transcripción. El síndrome de Rubinstein-Taybi está causado por mutaciones en el gen *CBP*. Los pacientes de Rubinstein-Taybi presentan retraso mental y otras anomalías del desarrollo, cuya severidad depende de la extensión de la mutación.

13. En la cromatina:
   A. un nucleosoma consiste en cuatro moléculas de histonas que rodean un núcleo de DNA.
   B. el DNA posicionado de manera que los surcos mayor y menor miren hacia el exterior es más accesible para la transcripción que si los surcos miran hacia el interior.
   C. la estructura del nucleosoma debe perderse por completo para que el DNA pueda ser transcrito.
   D. el DNA internucleosómico es el único que puede unirse a factores de transcripción.
   E. el octámero de histonas está formado por ocho clases diferentes de histonas.

14. La acetilación de las histonas puede dar lugar a estructuras más abiertas:
   A. debilitando la atracción electrostática entre las histonas y el DNA.
   B. provocando la interacción de las histonas con el dominio C-terminal (CTD) de la RNA polimerasa.
   C. provocando la repulsión electrostática entre las histonas y el DNA.
   D. facilitando la metilación del DNA.
   E. atrayendo los factores de transcripción hacia el DNA.

Problemas

15. ¿Cuál será la situación de la transcripción del operón *lac* (*a*) en presencia de glucosa y (*b*) en ausencia de glucosa, con lactosa presente en ambos casos, si hay una mutación que produce adenil ciclasa inactiva?
16. En un operón para la síntesis de un aminoácido, controlado completamente o en parte por atenuación, ¿por qué la presencia del aminoácido impide la transcripción del operón completo, mientras que la ausencia del aminoácido la permite?

RESPUESTAS

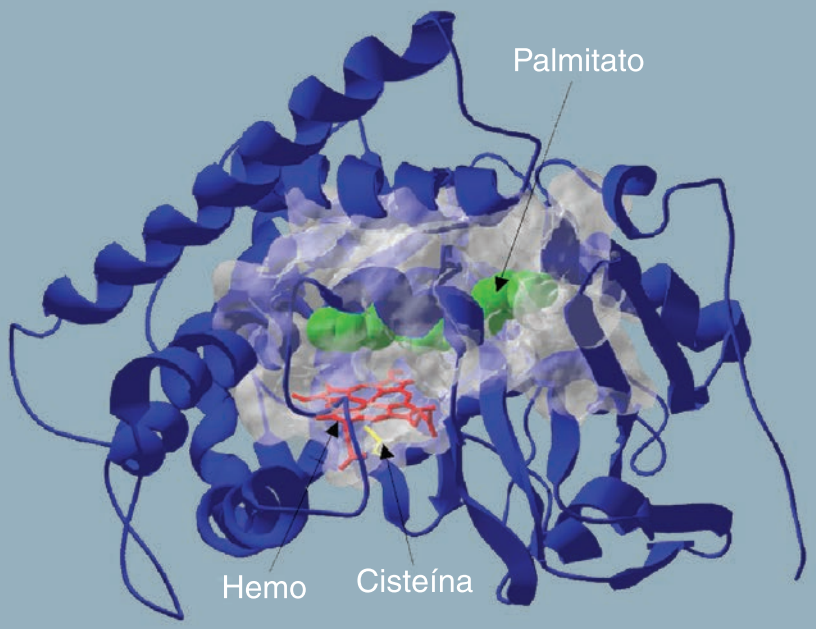
1. **B** El verdadero inductor es la alolactosa, que se forma normalmente a partir de la lactosa por acción de la β-galactosidasa. A: véase más arriba. C, D: Además de la unión del azúcar al represor, el cAMP debe unirse a la proteína CAP y el complejo cAMP–CAP actúa como un control positivo de la transcripción. E: El operón *lac* no presenta correpresión.
2. **B** La inducción y la represión son algunos de los mecanismos que se utilizan en el control de los operones. A: En un operón los genes estructurales están bajo control coordinado. C: El promotor y el operador son elementos que están en la misma cadena de DNA que el operón al que controlan; no difunden. D: Normalmente, la regulación de los operadores es algo laxa; se sintetiza una cierta cantidad de producto incluso en el estado reprimido. E: Otro mecanismo para la regulación de un operón es la atenuación.
3. **D** Si el operador no puede unirse al represor, la tasa de transcripción es superior a la del nivel basal. A: El producto del gen *lac*I es la proteína represora. Cuando esta proteína se une a un inductor, cambia su conformación, ya no puede unirse al sitio del operador del DNA, y la transcripción se produce a una veloci-

dad más alta. La no unión al inductor evita que se den estos efectos. B y C: En presencia de glucosa se produce represión por catabolito. La glucosa hace disminuir el nivel intracelular del cAMP. La proteína activadora del catabolito (CAP) no puede unirse al cAMP, por lo que no hay complejo cAMP–CAP para activar la transcripción. E: En el operón *lac* no existe correpresión.

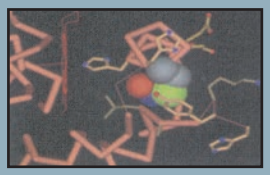
4. **A** Los operones son mecanismos de regulación procarióticos B–D: Un operón es la unidad reguladora completa de una agrupación de genes, incluidos los genes estructurales (que se transcriben juntos formando un mRNA policistrónico), los genes reguladores y los elementos de control, como por ejemplo el operador. E: Un operón puede tener más de un promotor, como el operón triptófano de *E. coli*.
5. **D** La función exacta de estas moléculas no se conoce, pero se producen rápidamente tan pronto como se agotan las reservas de aminoácidos.
6. **B** El triptófano, en el contexto del operón triptófano, se denomina correpresor, para distinguirlo de la proteína represora a la cual debe unirse.
7. **C** La síntesis del péptido conductor tiene un alto grado de dependencia de la disponibilidad de este aminoácido, ya que debe ser incorporado varias veces. Cuando no está disponible en cantidad suficiente el ribosoma se atasca y forma una estructura secundaria diferente del lazo en horquilla que actúa de señal de terminación, por lo tanto la transcripción continúa.
8. **C** En este operón, el ribosoma encallado estimula la transcripción de los genes estructurales de más abajo.
9. **E** A: TBP es parte del factor de transcripción general TFIID. B: Están implicadas muchas proteínas. C: La actividad helicasa está asociada a uno de los factores de transcripción (TFIIH). D: El CTD debe encontrarse en su forma no fosforilada para que la RNA polimerasa entre a formar parte del complejo de preiniciación. Más tarde debe ser fosforilada para abandonar el sitio de formación.
10. **C** Los factores de transcripción unidos a los potenciadores entran en contacto con el complejo de preiniciación gracias a la formación de un lazo por el DNA que aproxima las posiciones distantes. A, B, E: Estas caacterísticas son propias de los elementos de respuesta, como el elemento de respuesta a los esteroides. D: Los potenciadores pueden actuar en ambas orientaciones, de nuevo gracias a que el DNA se pliega sobre sí mismo.
11. **C** Estos fosfatos de guanosina son sisntetizados por el producto del gen *rel*A; inhiben la iniciación de la transcripción de los genes de los rRNA y tRNA, al bloquear la síntesis de proteínas en general. Esta es la respuesta estricta.
12. **E** Se ha demostrado para el transposón *Tn*3. A: La mayor parte de transposiciones implican la síntesis de una copia adicional del transposón, que se inserta en algún otro lugar del DNA. B: La copia puede insertarse en una molécula distinta de DNA. C: La longitud varía considerablemente, dependiendo del número de genes incorporados en el transposón. D: La mayoría de los sitios diana carecen aparentemente de características de secuencia particulares, aunque algunos transposones tienden a insertarse en "puntos calientes" específicos.
13. **B** La formación del complejo de iniciación de la transcripción y otras proteínas implicadas en la expresión génica necesita el acceso a los surcos del DNA. A, E: El núcleo del nucleosma es un octámero formado por dos moléculas de cada una de las cuatro distintas histonas. C: Un desplazamiento de 5 pb en la asociación del DNA con el núcleo de histonas es suficiente para cambiar la orientación de los surcos y permitir el acceso. D: Es el DNA del nucleosoma él que está implicado en la unión de factores de transcripción y otras proteínas.
14. **A** La acetilación de un grupo ϵ-amino de las lisinas cercanas al extremo N-terminal de las histonas cambia una carga positiva por una especie neutra, por lo tanto, hay menos atracción con los fosfatos negativos del DNA. B: La entidad responsable es un complejo de proteínas denominado SWI/SNF. C: El cambio es de positivo a neutro, no a negativo, por lo tanto, no hay repulsión electrostática. D: La metilación del DNA no afecta a la transcripción, pero es un fenómeno no relacionado con la acetilación de las histonas. E: La relajación del empaquetamiento del DNA por la acetilación puede hacer posible el acceso de los factores de transcripción, pero las histonas acetiladas por sí mismas no atraen a los factores de transcripción.
15 Normalmente, la glucosa disminuye el nivel intracelular de cAMP. Hay, pues, poco o nada del complejo CAP-cAMP para activar la transcripción. La falta de control positivo significa que la transcripción del operón es baja. La misma situación existiría en esta mutación. Normalmente, en ausencia de glucosa, el cAMP es alto, actúa el control positivo y se transcribe el operón *lac*. En esta mutación no puede formarse cAMP pues el enzima necesario es defectivo. No hay control positivo y el operón *lac* no será transcrito con eficiencia aunque no haya glucosa o sacarosa presentes.
16 Estos operones codificarán un péptido conductor con uno o más codones del aminoácido en cuestión. Una vez se ha sintetizado el péptido conductor, éste puede adoptar diferentes estructuras secundarias, dependiendo de que el ribosoma se haya atascado o no en esta región. Si el ribosoma no se ha atascado porque hay suficiente aminoácido (y por lo tanto tRNA cargado), la estructura secundaria actúa de señal de terminación y la síntesis se detiene. Si el ribosoma se encalla a causa de una cantidad insuficiente de tRNA cargado, la estructura secundaria que se forma no es reconocida como una señal de terminación y la transcripción prosigue a lo largo del operón.

PARTE III

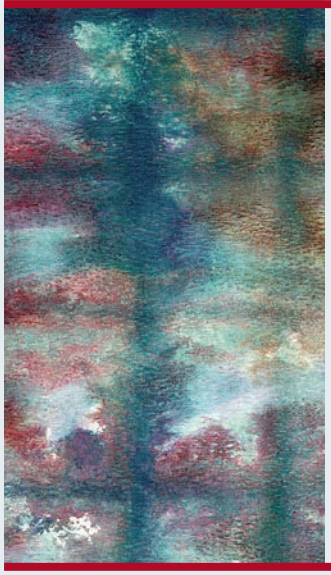
FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS



Las diferentes proteínas sintetizadas por las células constituyen la expresión fenotípica de los genes. Las proteínas cumplen funciones estructurales, catalíticas, mensajeras, reguladoras y de transporte. La figura superior corresponde a un miembro de una importante familia de proteínas, los citocromos P450; en la Figura 11.2 se presenta una descripción de esta proteína. Los cuatro capítulos siguientes describen la estructura y función de diferentes clases de proteínas. Las actividades de proteínas específicas se describen en capítulos posteriores a medida que se relacionan con las diversas funciones celulares. La modificación estructural de una proteína debida a cambios genéticos o a la modificación directa por factores exógenos puede conducir a diferentes patologías.



9



PROTEÍNAS II: RELACIÓN ESTRUCTURA–FUNCIÓN DE FAMILIAS DE PROTEÍNAS

Richard M. Schultz y
Michael N. Liebman

9.1 VISIÓN GENERAL 368

9.2 MOLÉCULAS DE ANTICUERPO: LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS 368

Las moléculas de anticuerpo (inmunoglobulinas) constan de cuatro cadenas polipeptídicas 369
Regiones constantes y variables de la estructura primaria 370
Las inmunoglobulinas de una misma clase contienen regiones homólogas comunes 371
En la estructura de un anticuerpo se encuentran secuencias de aminoácidos repetidas y dominios tridimensionales homólogos 372
Existen dos sitios de unión de antígeno por molécula de anticuerpo 375
Genética de las inmunoglobulinas 376
El plegamiento de la inmunoglobulina es una estructura terciaria que se encuentra en una gran familia de proteínas con papeles funcionales diferentes 377

9.3 PROTEÍNAS CON UN MECANISMO CATALÍTICO COMÚN: SERINA PROTEASAS 377

Los enzimas proteolíticos se clasifican según su mecanismo catalítico 378
Las serina proteasas presentan una notable especificidad por el sitio de hidrólisis del enlace peptídico 379
Las serina proteasas se sintetizan en forma de zimógeno 381
Existen inhibidores proteicos específicos de serina proteasas 382
Las serina proteasas tienen relaciones estructura–función similares 383
Homología de secuencia de aminoácidos en las serina proteasas 384
Las estructuras terciarias de la familia tripsina de las serina proteasas son similares 385

9.4 PROTEÍNAS DE UNIÓN A DNA 387

Los tres principales motivos estructurales de las proteínas de unión al DNA 387
Las proteínas de unión a DNA utilizan diversas estrategias para interaccionar con el DNA 390

9.5 HEMOGLOBINA Y MIOGLOBINA 393

La hemoglobina humana se encuentra en varias formas 393
La mioglobina: una cadena polipeptídica única con un sitio de fijación de O_2 394
En el sitio de fijación de O_2 se encuentra un grupo prostético hemo 395
La cristalografía de rayos X ha contribuido a la definición de la estructura de la hemoglobina y de la mioglobina 396
Estructuras primaria, secundaria y terciaria de la mioglobina y de las cadenas individuales de la hemoglobina 396
Un equilibrio sencillo describe la unión de O_2 a la mioglobina 397
La unión de O_2 a la hemoglobina requiere la cooperatividad entre las subunidades de la hemoglobina 399
Mecanismo molecular de la cooperatividad en la fijación de O_2 399
La hemoglobina facilita el transporte de CO_2 y de NO 403
La disminución en el pK_a de grupos ácidos al cambiar de la conformación T a la R conduce a la disociación de protones 403
El efecto Bohr acopla el transporte de CO_2 desde los tejidos a los pulmones con el transporte de O_2 de los pulmones a los tejidos 404
El 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) en los eritrocitos modula la disociación de oxígeno de la hemoglobina 406
La hemoglobina descarga óxido nítrico (NO) en la pared de los capilares de tejidos en los que promueve la descarga de O_2 407

BIBLIOGRAFÍA 409

PREGUNTAS 410

RESPUESTAS 411

APLICACIONES CLÍNICAS

9.1 Proteínas del sistema del complemento 371
9.2 Funciones de las diferentes clases de anticuerpos 372
9.3 Inmunización 372
9.4 Formación de fibrina en el infarto de miocardio y acción del activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA) 378
9.5 Participación de las serina proteasas en la metástasis celular tumoral 379
9.6 Hemoglobinopatías 394

9.1 VISIÓN GENERAL

En el Capítulo 3 se expusieron los fundamentos de la arquitectura de las proteínas, incluyendo la organización estructural y las propiedades físicas y químicas de los aminoácidos, la organización jerárquica de las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, y las fuerzas que mantienen unidas las moléculas y les proporcionan la flexibilidad observada en su movimiento dinámico. Allí se introdujeron herramientas de cálculo y de experimentación que permiten el análisis de las características estructurales con gran resolución, así como su respuesta conformacional frente a distorsiones que pueden ir desde una simple perturbación de la solución hasta aspectos de su interacción con otras moléculas que definen su función biológica. El concepto de la interrelación entre estructura y función se introdujo mediante ejemplos de conservación de estructura y función.

En este capítulo se examina la relación específica entre estructura y función en cuatro grupos funcionales: las inmunoglobulinas, las serina proteasas, las proteínas de unión a DNA y las hemoglobinas. Este estudio se realiza mediante el examen de las variaciones en la secuencia de aminoácidos, la organización estructural y la función biológica. A través de la observación de este tipo de variaciones dentro de una **familia de proteínas** específica se puede apreciar mejor la importancia de la relación entre estructura y función.

La familia de las **inmunoglobulinas** proporciona ejemplos de una arquitectura en multidominios que permite el reconocimiento de moléculas ajenas al organismo y su unión a ellas para sucuestrarlas. La diversidad entre los miembros de esta familia es la fuente de su capacidad de reconocimiento molecular específico y de unión individualizada.

Las **serina proteasas** proporcionan ejemplos de una familia de enzimas que parecen haber divergido para llevar a cabo funciones fisiológicas específicas, a menudo organizadas dentro de procesos enzimáticos en cascada altamente organizados. La similitud inherente en el mecanismo catalítico y en la estructura tridimensional constituye un nexo común.

Las **proteínas de unión a DNA** son multifamilias de proteínas que se unen a sitios de regulación en el DNA y regulan la expresión de un subconjunto específico de genes, un hecho sorprendente si se considera que el genoma de los mamíferos contiene aproximadamente 30 000 genes de copia única. Tales proteínas poseen motivos estructurales que les permiten unirse de forma selectiva a sitios de regulación de genes específicos.

La familia de las **hemoglobinas** ofrece ejemplos de un sistema de regulación muy fina que lleva a cabo simultáneamente múltiples funciones fisiológicas estrechamente reguladas. Las proteínas pueden tener pequeñas sustituciones o mutaciones y mantener aún sus funciones fisiológicas; muchas de estas sustituciones se han estudiado desde la perspectiva de sus consecuencias clínicas. Esta familia muestra la diversidad potencial de las sustituciones de aminoácidos que pueden ser toleradas, y con las cuales la proteína puede seguir cumpliendo de forma aceptable su función fisiológica.

9.2 MOLÉCULAS DE ANTICUERPO: LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Las moléculas de anticuerpos se producen en respuesta a la invasión de compuestos foráneos, tales como proteínas, polímeros de glúcidos y ácidos nucleicos. Una molécula de anticuerpo se asocia de forma no covalente con la sustancia foránea, iniciando así un proceso que tiene la finalidad de eliminarla del organismo.

Las moléculas que inducen la producción de anticuerpos se denominan **antígenos** y pueden contener múltiples determinantes antigénicos, que son pequeñas regiones de la molécula de antígeno que inducen la producción de un anticuerpo

específico al cual se une el antígeno. En las proteínas, un determinante antigénico puede comprender sólo seis o siete aminoácidos.

Un **hapteno** es una molécula pequeña que por sí sola no puede inducir la producción de anticuerpos específicos. Sin embargo, cuando se encuentra unido covalentemente a una molécula mayor, puede actuar como determinante antigénico e inducir la síntesis de anticuerpo. Mientras que la molécula de hapteno requiere la unión a una molécula mayor para inducir la síntesis de anticuerpo, una vez separado de su portador, el hapteno retiene su capacidad de unirse fuertemente al anticuerpo.

Se calcula que el ser humano puede producir potencialmente alrededor de 1×10^8 estructuras diferentes de anticuerpos. Sin embargo, todos los anticuerpos tienen una estructura similar. La determinación de la estructura se ha conseguido a partir de estudios de estructuras primarias de inmunoglobulinas y de difracción de rayos X, que muestran la estructura tridimensional de la molécula de anticuerpo sola o acomplejada con un antígeno.

Los estudios estructurales de proteínas requieren preparaciones puras y homogéneas. Tales muestras de anticuerpos son extremadamente difíciles de obtener a partir del plasma, debido a la gran diversidad de moléculas de anticuerpo presentes. Sin embargo, pueden prepararse anticuerpos homogéneos mediante la técnica de los hibridomas monoclonales, en la cual se fusionan células de mieloma de ratón y linfocitos B productores de anticuerpo, también de ratón, y se obtienen células de hibridoma inmortales que expresan un solo anticuerpo.

Las moléculas de anticuerpo (inmunoglobulinas) constan de cuatro cadenas polipeptídicas

Las **moléculas de anticuerpo** son **glucoproteínas** compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos copias idénticas de cada una de dos cadenas polipeptídicas distintas. Dos cadenas ligeras (L) de secuencia idéntica se combinan con dos cadenas pesadas (H) de secuencia idéntica para formar la estructura $(LH)_2$. En el tipo más común de inmunoglobulina, IgG, las cadenas H tienen aproximadamente 440 aminoácidos (50 kDa). Las cadenas polipeptídicas L más pequeñas contienen alrededor de 220 aminoácidos (25 kDa). Las cuatro cadenas polipeptídicas están interconectadas covalentemente por puentes disulfuro (Figuras 9.1 y 9.2). Cada cadena H está asociada con una cadena L de manera tal que los extremos NH_2-terminales de ambas cadenas se encuentran próximos entre sí. Debido a que el tamaño de la cadena L es la mitad que el de la cadena H, sólo la mitad NH_2-terminal de la cadena H está asociada con la cadena L.

En las otras clases de inmunoglobulinas (véase Tabla 9.1) las cadenas H son ligeramente más largas que las de la clase IgG. A la cadena H se le une una cantidad variable de glúcido (2 al 12% según la clase de inmunoglobulina).

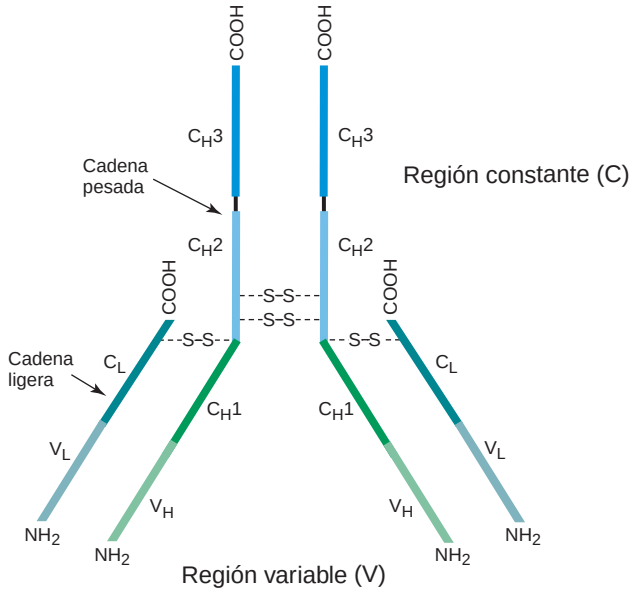


FIGURA 9.1
Representación lineal de la molécula de anticuerpo IgG.
Los extremos COOH-terminal y NH_2-terminal de las dos cadenas H y las dos cadenas L están orientados en la misma dirección, tal como se muestra. Puentes disulfuro unen las cadenas pesadas (H) entre sí y con las cadenas ligeras (L). Los dominios de la región constante (C) de la cadena H se denominan C_H1, C_H2 y C_H3. La región constante de la cadena L se designa como C_L, y las regiones variables (V) de las cadenas L y H se denominan V_L y V_H, respectivamente.
Basado en la figura de Burton, D. R. En: F. Calabi y M. S. Neuberger (Eds.), Molecular Genetics of Immunoglobulin. *Amsterdam: Elsevier, 1987, pp. 1–50.*

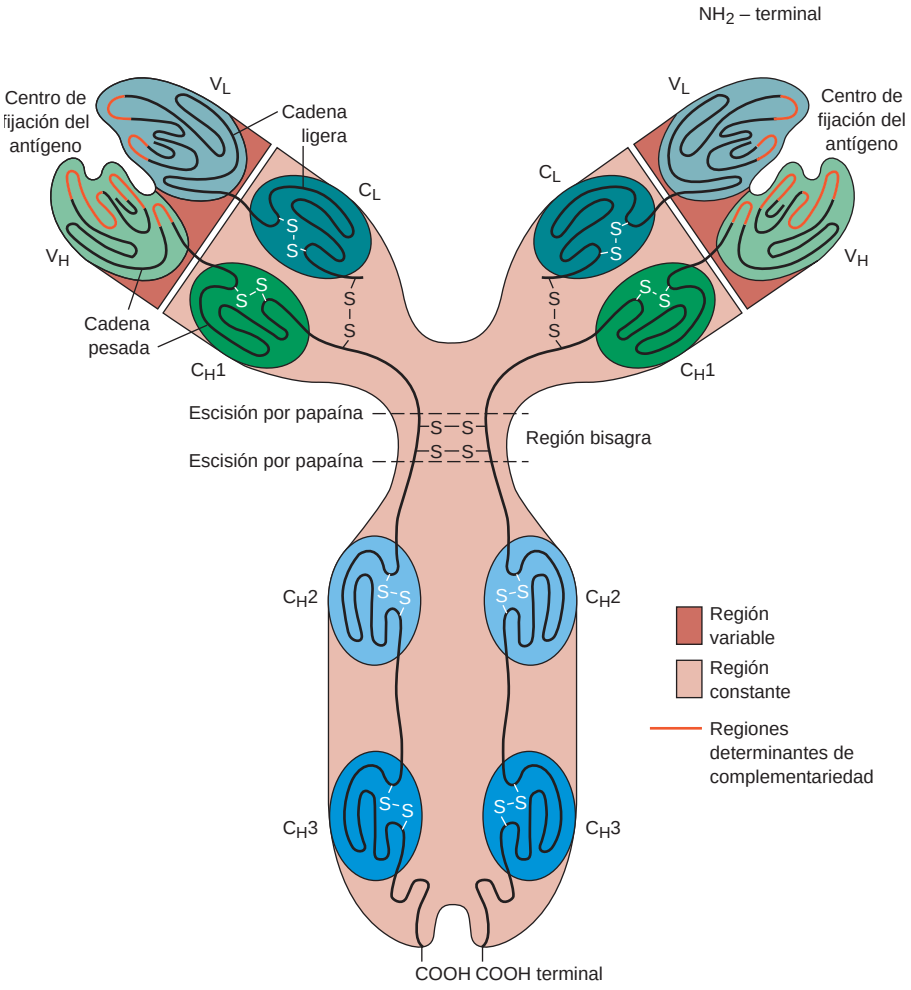


FIGURA 9.2
Estructura diagramática de la IgG.
Las cadenas ligeras (L) se dividen en dominios V_L (secuencia de aminoácidos variable) y C_L (secuencia de aminoácidos constante). Las cadenas pesadas (H) se dividen en dominios V_H (secuencia de aminoácidos variable) y C_H1, C_H2 y C_H3. Los centros de fijación de antígeno son V_H–V_L. Los polipéptidos "bisagra" conectan los dominios. Se muestran las posiciones de los enlaces cistina inter e intracatenarios.
De Cantor, C. R. y Schimmel, P. R. Biophysical Chemistry, *Part I. San Francisco: Freeman, 1980. Reproducido con permiso de Mr. Irving Geis, New York.*

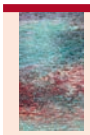
Regiones constantes y variables de la estructura primaria

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las moléculas de anticuerpo inducidas frente a diferentes antígenos muestran que existen regiones de homología de secuencia y regiones de variabilidad de secuencia. En concreto, las secuencias de la mitad NH_2-terminal de las cadenas L y un cuarto de la secuencia también NH_2-terminal de las cadenas H son muy variables. Estos segmentos NH_2-terminales constituyen las **regiones variables (V)** y se designan como dominios V_H y V_L de las cadenas H y L, respectivamente. Dentro de estos dominios V, determinados segmentos son "hipervariables". En el dominio V_L se encuentran comúnmente tres **regiones hipervariables** de entre 5 y 7 residuos, y en el dominio V_H tres o cuatro regiones hipervariables de entre 6 y 17 residuos. Las secuencias hipervariables también se denominan **regiones determinantes de la complementariedad (CDR)**, ya que forman el sitio de unión al antígeno, con topología complementaria a la estructura del antígeno.

TABLA 9.1 Clases de inmunoglobulinas

Tipos de inmunoglobulina	*Masa molecular aproximada*	*Isotipo de la cadena H*	*Glúcido en peso (%)*	*Concentración en el suero (mg 100 mL^{-1})*
IgG	150 000	γ, 53 000	2–3	600–1800
IgA	170 000–720 000[a]	α, 64 000	7–12	90–420
IgD	160 000	δ, 58 000		0,3–40
IgE	190 000	ε, 75 000	10–12	0,01–0,10
IgM	950 000[a]	μ, 70 000	10–12	50–190

[a] Forma estructuras poliméricas de la unidad básica estructural.



APLICACIÓN CLÍNICA 9.1
Proteínas del sistema del complemento

En el plasma hay al menos 11 proteínas del complemento distintas (véase p. 1032 para su designación). Se activan por la asociación de anticuerpos IgG o IgM con antígenos en la superficie externa de células bacterianas, protozoos o células tumorales. Después del proceso de fijación de la inmunoglobulina, las 11 proteínas del complemento se activan secuencialmente y se asocian con la membrana celular, produciendo la lisis de la membrana y la muerte de la célula diana.

Muchas de las proteínas del complemento son precursores de enzimas proteolíticos que están presentes en forma inactiva. A consecuencia de su activación, éstas activarán a su vez la siguiente proteína de la ruta por hidrólisis de un enlace peptídico específico de la segunda proteína, dando lugar a un proceso en cascada. La activación por proteólisis específica (es decir, hidrólisis de un enlace peptídico específico) es un importante método general de activación de enzimas extracelulares. Por ejemplo, los enzimas que catalizan la formación de coágulos de sangre, los que inducen la fibrinólisis de los coágulos sanguíneos, y los que digieren proteínas de la dieta en el intestino, son todos ellos activados mediante proteólisis específica catalizada por un segundo enzima (véanse pp. 1034, 1098).

Al producirse la asociación a un antígeno celular queda expuesto un sitio de unión del complemento en la región F_c del anticuerpo, lo que provoca la unión de las proteínas C1 del complemento, las cuales constituyen un complejo compuesto por tres proteínas distintas: C1q, C1r y C1s. Las proteínas C1r y C1s experimentan un cambio conformacional y se convierten en enzimas activos sobre la superficie de la célula. El complejo C1 activado (C1a) hidroliza un enlace peptídico en las proteínas del complemento C2 y C4, las cuales entonces también se asocian a la superficie celular. El complejo activo C2–C4 tiene una actividad proteolítica que hidroliza un enlace peptídico en la proteína del complemento C3. La proteína C3 activada se fija a la superficie celular y el complejo C2–C4–C3 activado activa a su vez la proteína C5. La proteína C5 activada se asocia con las proteínas del complemento C6, C7, C8 y seis moléculas de C9. Este complejo multiproteico se fija a la superficie celular e inicia la lisis de la membrana.

El mecanismo es del tipo de cascada en el que tiene lugar la amplificación del detonante. Resumiendo, la molécula C1 activada puede activar múltiples moléculas de C2–C4–C3 y cada complejo C2–C4–C3 activado puede, a su vez, activar muchas moléculas de C5 a C9. En el siguiente esquema se resume la serie de reacciones de la ruta clásica del complemento, en donde "a" y "b" designan las proteínas modificadas de forma proteolítica y una línea por encima de una proteína indica una actividad enzimática.

$$\text{IgG o IgM} \xrightarrow{\text{Clq,Clr,Cls}} \overline{\text{C1a}} \xrightarrow{\text{C2,C4}}$$
$$\text{C4b} \cdot \overline{\text{C2a}} \xrightarrow{\text{C3}}$$
$$\text{C4b} \cdot \overline{\text{C2a}} \cdot \text{C3b} \xrightarrow{\text{C5,C6,C7,C8,C9}}$$

Existe una "ruta alternativa" para la activación de C3 del complemento, iniciada por agregados de IgA o por polisacáridos bacterianos en ausencia de fijación de inmunoglobulina a los antígenos de la membrana celular. Esta ruta alternativa implica la proteína properdina, la convertasa del proactivador de C3 y el proactivador de C3.

Uno de los papeles principales de los sistemas del complemento es la generación de opsoninas. Opsonina es un término antiguo aplicado a las proteínas que estimulan la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos. La principal opsonina es la C3b; los macrófagos poseen receptores específicos para esta proteína. Los pacientes con deficiencia hereditaria de C3 son susceptibles a repetidas infecciones bacterianas.

Colten, H. R. y Rosen, F. S. Complement deficiencies. *Annu. Rev. Immunol.* 10:809, 1992; y Morgan, B. P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 32:265, 1995.

Por el contrario, las tres cuartas partes del extremo COOH-terminal de las cadenas H y la mitad COOH-terminal de las cadenas L presentan homología de secuencia con otras cadenas H y L de la misma clase. Estas **regiones constantes (C)** se designan como C_H y C_L en las cadenas H y L, respectivamente. Las regiones C_H determinan la clase a la que pertenece el anticuerpo, proporcionan los sitios de fijación de las proteínas del complemento (véase Apli. Clín. 9.1) y constituyen la región necesaria para que los anticuerpos crucen la membrana placentaria. Las regiones V determinan la especificidad de la molécula de anticuerpo con respecto al antígeno.

Las inmunoglobulinas de una misma clase contienen regiones homólogas comunes

Las diferencias entre las secuencias de las regiones C_H de diferentes clases de inmunoglobulinas son las responsables de las diferentes características físicas de cada clase. En algunos casos, la secuencia C_H promueve la polimerización de las moléculas con la estructura molecular básica $(LH)_2$. De esta manera, los anticuerpos de la clase IgA son a menudo estructuras diméricas unidas covalentemente $[(LH)_2]_2$. De modo parecido, las moléculas de IgM son pentámeros $[(LH)_2]_5$. Las diferentes cadenas H se designan, γ, α, μ, δ y ε según se encuentren en las clases de inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE respectivamente (Tabla 9.1; véase Apli. Clín. 9.2). Se sintetizan dos tipos de secuencias de cadena L, designadas como cadenas lambda (λ) y kappa (κ), y cualquiera de ellas se combina con las cinco clases de cadenas H.

APLICACIÓN CLÍNICA 9.2
Funciones de las diferentes clases de anticuerpos

La clase de inmunoglobulinas IgA se encuentra en las secreciones mucosas (bronquiales, nasales e intestinales, lágrimas, leche y calostro). Estas inmunoglobulinas son la defensa inicial contra los patógenos víricos y bacterianos invasores, antes de que éstos entren en el plasma o en otro espacio interno.

La clase IgM se encuentra primordialmente en el plasma. Son los primeros anticuerpos que se producen en cantidad significativa cuando se introduce un antígeno foráneo. Los anticuerpos IgM promueven la fagocitosis de microorganismos por los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, y son también potentes activadores del complemento (véase Apli. Clín. 9.1). Los anticuerpos IgM se pueden encontrar en muchas secreciones externas, aunque en cantidades inferiores a las de IgA.

La clase IgG se encuentra en el plasma a altas concentraciones. Su respuesta a antígenos extraños necesita un período de tiempo superior al de las IgM. Cuando se hallan presentes a concentraciones máximas, lo hacen también a concentraciones significativamente más elevadas que las de los anticuerpos IgM. Al igual que los anticuerpos IgM, los anticuerpos IgG promueven la fagocitosis en el plasma y activan el complemento.

Las funciones biológicas normales de las clases de inmunoglobulinas IgD e IgE no se conocen; no obstante, los anticuerpos IgE juegan un papel importante en las respuestas alérgicas, tales como el shock anafiláctico, la fiebre del heno y el asma.

La deficiencia de inmunoglobulinas suele acarrear una mayor susceptibilidad a las infecciones. La agammaglobulinemia unida al X y la inmunodeficiencia variable común constituyen dos ejemplos. El trastorno más común es una deficiencia selectiva de IgA, que da lugar a infecciones recurrentes de los senos y el tracto respiratorios.

Rosen, F. S., Cooper, M. D. y Wedgewood, R. J. P. The primary immuno-deficiencies. *N. Engl. J. Med.* 311:235 (Part 1); 300 (Part II), 1984.

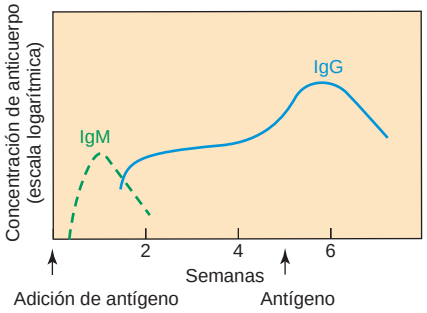


FIGURA 9.3
Aparición de anticuerpos IgM e IgG específicos para un antígeno añadido.
Basado en una figura de Stryer, L. Bioquímica, *Editorial Reverté, Barcelona, 1995.*

La IgG es la inmunoglobulina mayoritaria en el plasma. La biosíntesis de un anticuerpo IgG específico en concentraciones significativas después de la exposición a un nuevo antígeno tarda unos 10 días (véase Apli. Clín. 9.3). En ausencia de una concentración inicialmente alta de IgG para un antígeno específico, la clase de anticuerpos IgM, que se sintetizan a mayor velocidad, se asociará con el antígeno, sirviendo así como una primera línea de defensa hasta la producción de grandes cantidades de IgG (Figura 9.3; véase Apli. Clín. 9.3).

En la estructura de un anticuerpo se encuentran secuencias de aminoácidos repetidas y dominios tridimensionales homólogos

En cada cadena polipeptídica de una molécula de anticuerpo se encuentra un patrón repetido de secuencias de aminoácidos. En las cadenas L y H de la clase IgG, el patrón repetitivo se observa entre segmentos de aproximadamente 110 aminoácidos. Si bien esta homología no es ni mucho menos exacta, sí se puede observar claramente un cierto número de aminoácidos que coinciden de forma idéntica si se alinean segmentos de 110 aminoácidos. Para otros aminoácidos, la coincidencia reside en la polaridad de la cadena lateral. Dado que las cadenas H tienen una longitud de aproxi-

APLICACIÓN CLÍNICA 9.3
Inmunización

Una vacuna puede estar constituida por células bacterianas muertas, virus inactivados, parásitos muertos, por formas no virulentas de bacterias vivas, una toxina bacteriana desnaturalizada o una proteína recombinante. La introducción de una vacuna en un ser humano puede conducir a una protección contra las formas virulentas de microorganismos o de agentes tóxicos que contienen el mismo antígeno. Los antígenos en el material no virulento no sólo provocan la diferenciación de las células linfoides en células que producen anticuerpo contra el antígeno extraño, sino que también provocan la diferenciación de ciertas células linfoides en células con memoria. Las células con memoria no excretan anticuerpos, sino que colocan anticuerpos contra el antígeno en su membrana exterior, en donde éstos actúan como futuros sensores del antígeno. Estas células con memoria son como un radar permanente para el antígeno potencialmente virulento. Cuando más tarde se produce la reintroducción del antígeno, la fijación de éste al anticuerpo de la superficie celular de las células con memoria estimula la división de éstas, dando lugar a células productoras de anticuerpos y a nuevas células con memoria. Este mecanismo reduce el tiempo requerido para la producción de anticuerpo tras la introducción de un antígeno, e incrementa la concentración de anticuerpo específico para el antígeno. Esta es la base para la protección inmunológica.

Entre las vacunas para adultos obtenidas recientemente se encuentran la vacuna neumocócica (prevención de la neumonía causada por *Diplococcus pneumoniae*), la vacuna contra la hepatitis B y la vacuna contra la gripe. Esta última cambia cada año a causa de la variación antigénica del virus de la gripe.

Flexner, C. New approaches to vaccination. *Adv. Pharmacol.* 21:51, 1990; y Sparling, P. F., Elkins, C., Wyrick, P. B. y Cohen, M. S. Vaccines for bacterial sexually transmitted infections: a realistic goal? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2456, 1994.

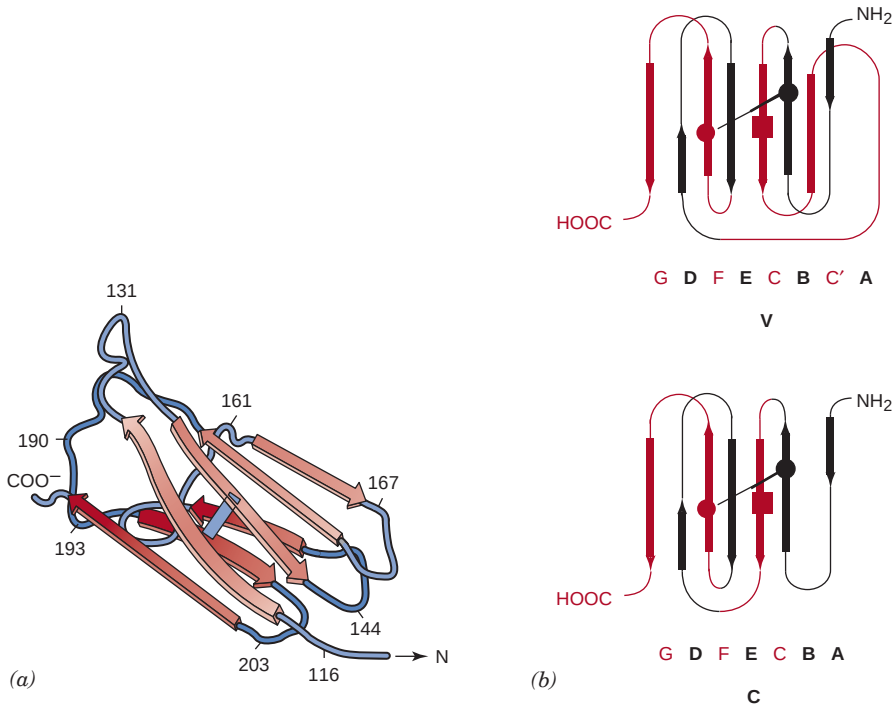


FIGURA 9.4
Plegamiento de la inmunoglobulina.
(*a*) Diagrama esquemático del plegamiento de un dominio C_L, que muestra la estructura de hoja β plegada. Las flechas indican las cadenas de hoja β y la barra (en azul claro) la posición del puente de cistina. Las flechas rosas representan las cadenas β del plano superior y las oscuras las cadenas β del plano inferior. (*b*) Esquema de la disposición (topología) de las cadenas β en el motivo del plegamiento de la inmunoglobulina. Los ejemplos corresponden a las regiones variable (diagrama superior) y constante (diagrama inferior) de las IgG. Las flechas gruesas indican las cadenas β y las líneas finas los lazos que las interconectan. Los círculos indican cisteínas que forman el puente disulfuro intradominios. Los cuadrados muestran la posición de los residuos de triptófano que son componentes invariables en el núcleo del plegamiento de la inmunoglobulina. Las letras negras en negrita indican las cadenas que forman un plano de la hoja, mientras que las otras letras forman el plano paralelo situado detrás del plano principal.
(a) De Edmundson, A. B., Ely, K. R., Abola, E. E., Schiffer, M. y Pavagiotopoulos, N. Biochemistry *14:3953, 1975. Copyright ©1975 by American Chemical Society. Reproducido con permiso.*
(b) Basado en una figura de Calabi, F. En: F. Calabi y M. S. Neuberger (Eds.), Molecular Genetics of Immunoglobulin. *Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 203.*

madamente 440 aminoácidos, esta repetición de secuencia homóloga aparece cuatro veces a lo largo de una cadena H de inmunoglobulina. Basándose en este patrón de secuencia, la cadena se divide en una región V_H y tres regiones C_H (denominadas C_H1, C_H2 y C_H3) (véanse Figuras 9.1 y 9.2). La cadena L de aproximadamente 220 aminoácidos se divide en una región V_L y una región C_L. Cada una de estas repeticiones contiene un puente disulfuro intracatenario que une dos cisteínas (Figura 9.2).

Los datos de difracción de rayos X muestran que los segmentos de 110 aminoácidos forman dominios estructurales separados con una estructura terciaria similar. Cada segmento de 110 aminoácidos de las cadenas H y L se pliega con una disposición específica pero similar de hojas β antiparalelas que da lugar a un ordenamiento de elementos secundarios conocido como **plegamiento de la inmunoglobulina** (Figura 9.4). Este motivo consta de 7 a 9 cadenas polipeptídicas que forman hojas β antiparalelas alineadas una frente a otra. Los dominios globulares son el resultado de la fuerte interacción entre dos plegamientos de la inmunoglobulina de dos cadenas separadas (Figura 9.5). Las interacciones se producen entre los plegamientos V_L–V_H y C_L–C_H1 de las cadenas H y L. En la mitad C-terminal de las ca-

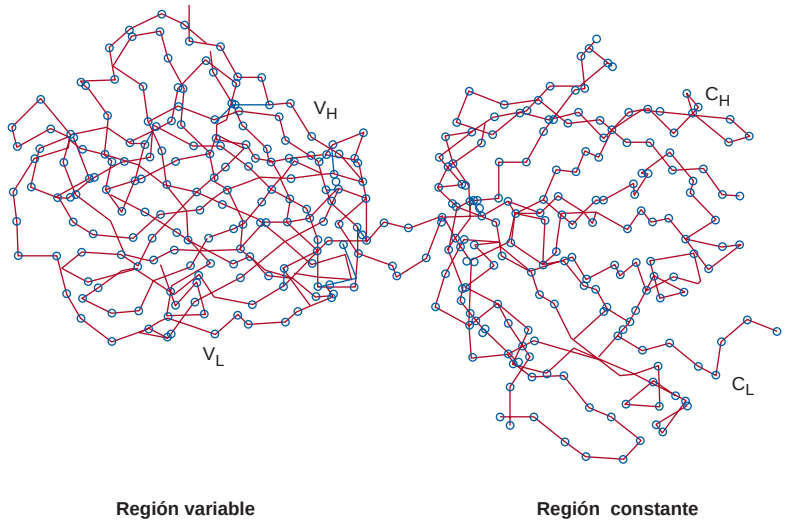


FIGURA 9.5
Estructura de carbonos α (○) del fragmento F_{ab} de la IgG KOL mostrando los dominios V_L–V_H y C_L–C_H1 interconectados por los polipéptidos bisagra.
Adaptada con permiso de Huber, R., Deisenhofer, J., Coleman, P. M., Matsushima, M. y Palm, W. En: The Immune System, *27th Mosbach Colloquium. Berlin: Springer-Verlag, 1976, p. 26.*

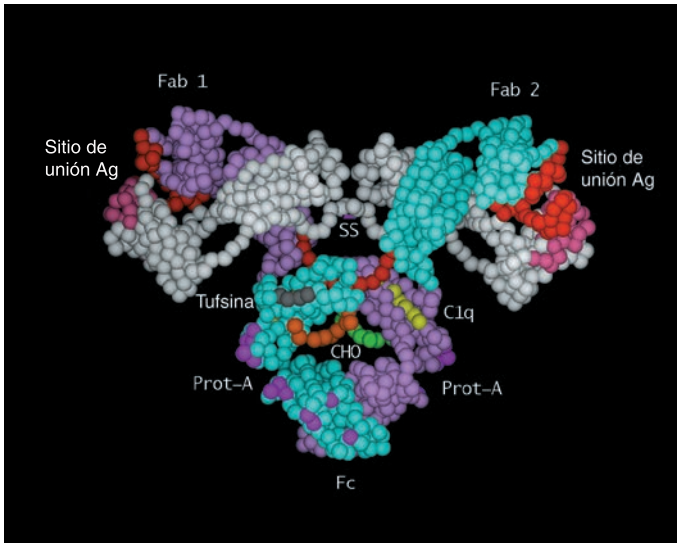


FIGURA 9.6
Modelo de una molécula de anticuerpo IgG.
Sólo aparecen los carbonos α de la estructura. Las dos cadenas L están representadas por las esferas en gris claro y las cadenas H por esferas en violeta y azul. Los glúcidos unidos a los dos dominios C_H2 están en verde y anaranjado. Las regiones CDR de los dominios V_H–V_L son de color rojo oscuro en las cadenas H y rosado en las L. El puente disulfuro intercatenario entre las cadenas L y H está representado mediante esferas y varillas de color magenta (está parcialmente escondido). La bisagra heptapeptídica entre los dominios C_H1 y C_H2, que conectan las unidades F_{ab} y F_c, están en color rojo oscuro. El centro del sitio del complemento C1q en los dominios C_H2 está en amarillo, los sitios de entrada de la proteína A en la unión de C_H2 y C_H3 en magenta, y el sitio de unión de la tufsina en C_H2 en gris. La tufsina es un tetrapéptido natural que induce fagocitosis por macrófagos y puede ser transportado unido a una inmunoglobulina. La proteína A es una proteína bacteriana con una elevada afinidad por la inmunoglobulinas. Véase la Figura 9.8 para la definición de Fab y Fc.
Fotografía cedida generosamente por Dr. Allen, Edmundson, de Guddat, L. W., Shan, L., Fan, Z-C., et al. FASEB J. *9:101, 1995.*

denas H, las dos cadenas se asocian formando los dominios C_H2–C_H2 y C_H3–C_H3 (Figura 9.2). En la estructura del anticuerpo, una secuencia polipeptídica "bisagra" interconecta los dos dominios V_H–C_H1 con el dominio C_H2–C_H2 (Figura 9.2). De este modo, la estructura del anticuerpo presenta seis dominios, cada uno de los cuales está formado por la asociación de dos plegamientos de la inmunoglobulina (Figuras 9.2 y 9.6). En el centro de un núcleo hidrofóbico del dominio V_L–V_H NH_2-terminal se encuentra una hendidura poco profunda en la cual se fija el antígeno. Las secuencias hipervariables de las hendiduras del dominio V forman lazos que se juntan entre sí, y constituyen los centros de fijación complementarios (regiones determinantes de la complementariedad, CDR) de antígeno (véanse Figuras 9.6 y 9.7). Las secuencias de los lazos hipervariables dan lugar a una conformación tridimensional única para cada anticuerpo que lo hace específico para su determinante antigénico. Tras la fijación del antígeno a los dominios V_L–V_H, se producen pequeños cambios en la conformación de las CDR, lo que indica que la fijación del antígeno induce un encaje por complementariedad óptimo con el sitio variable de la CDR.

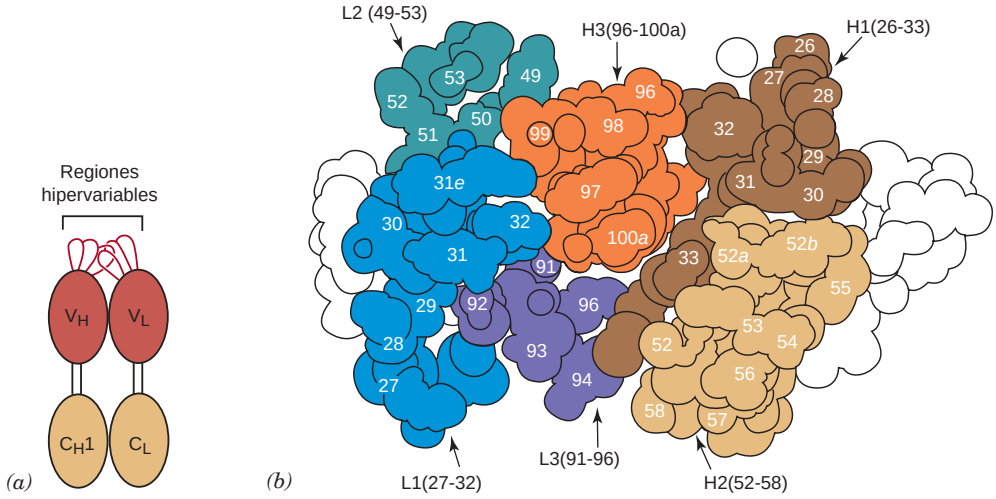


FIGURA 9.7
Bucles hipervariables de la inmunoglobulina.
(*a*) Diagrama esquemático que muestra los bucles hipervariables (CDR) del dominio V_L–V_H que forman el sitio de fijación de antígeno. (*b*) Corte transversal de un sitio de fijación de antígeno que muestra la contribución de los diferentes CDR, utilizando modelos espaciales CPK para representar a los átomos. Los números se refieren a la posición de los aminoácidos en la secuencia de las regiones de lazo hipervariable de las cadenas ligera (L) y pesada(H).
(a) Modificado de Branden, C. y Tooze, J. Introduction to Protein Structure. *New York: Garland Publishing, 1991, p. 187.*
(b) Modificado de Branden, C. y Tooze, J. Introduction to Protein Structure. *New York: Garland Publishing, 1991, p. 189, y atribuido a Chothia, C. y Lesk, A.* J. Mol. Biol. *196:914, 1987.*

La fijación del antígeno también puede inducir cambios conformacionales entre los dominios V_L–V_H y los dominios restantes, activando los sitios efectores, tal como sucede en la fijación del complemento al dominio C_H2–C_H2 (véase el sitio C1q en la Figura 9.6). La fuerza de la asociación entre antígeno y anticuerpo se debe a fuerzas no covalentes (véase p. 135). La complementariedad entre las estructuras del determinante antigénico y del centro de fijación de antígeno da como resultado unas constantes de afinidad extremadamente elevadas, entre 10^5 y 10^{10} M^{-1} (fuerza de 7–14 kcal mol^{-1}) para esta asociación no covalente.

Existen dos sitios de unión de antígeno por molécula de anticuerpo

Los dominios variables (V) NH_2-terminales de cada par de cadenas L y H (V_L–V_H) contienen un centro de fijación de antígeno; existen, por lo tanto, dos centros de fijación de antígeno por molécula de anticuerpo. La existencia de un centro de fijación de antígeno en cada par LH se ha demostrado por tratamiento de las moléculas de anticuerpo con el enzima proteolítico papaína, que hidroliza un enlace peptídico en el péptido bisagra de cada cadena H (véanse Figuras 9.2, 9.6 y 9.8). La molécula del anticuerpo se escinde en tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y comprenden la mitad NH_2-terminal de la cadena H (V_H–C_H1) asociada con toda la cadena L (Figura 9.8). Cada uno de estos fragmentos fija antígeno con una afinidad similar a la de la molécula de anticuerpo completo y se denominan **fragmentos F_{ab}** (de "antigen binding", fijación de antígeno). El otro producto obtenido por hidrólisis con papaína es la mitad COOH-terminal de las cadenas H (C_H2–C_H3), que se mantienen unidas mediante un enlace disulfuro. Este es el **fragmento F_c** (de "crystallizable", cristalizable), que no tiene afinidad para fijar antígeno. Dentro del fragmento F_{ab}, la cadena L se puede disociar del segmento correspondiente de la cadena H mediante reducción de los puentes disulfuro, eliminándose la capacidad de fijar antígeno. En consecuencia, cada centro de fijación de antígeno ha de estar formado por componentes tanto de los dominios de la cadena L (V_L) como de la cadena H (V_H) en actuación conjunta.

En resumen, entre las características principales de la estructura del anticuerpo y de las interacciones antígeno–anticuerpo se incluyen las siguientes: (1) Las cadenas polipeptídicas se pliegan en dominios múltiples, presentando cada dominio un motivo estructural de plegamiento de la inmunoglobulina. (2) Dos plegamientos de la inmunoglobulina en cadenas separadas se asocian para formar los seis dominios de la estructura básica de la inmunoglobulina. Los segmentos V_L y V_H se asocian para formar los dos dominios NH_2-terminales que fijan el antígeno. (3) El centro de fijación de antígeno de los dominios V_L–V_H está generado por lazos hipervariables (CDR), que forman una superficie continua con una topología complementaria a la del determinante antigénico. (4) Las fuertes interacciones entre el antígeno y las CDR del anticuerpo no son covalentes, sino que se deben a fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. En las asociaciones antígeno-anticuerpo los puentes salinos participan en mucho menor grado. (5) Tras la fijación

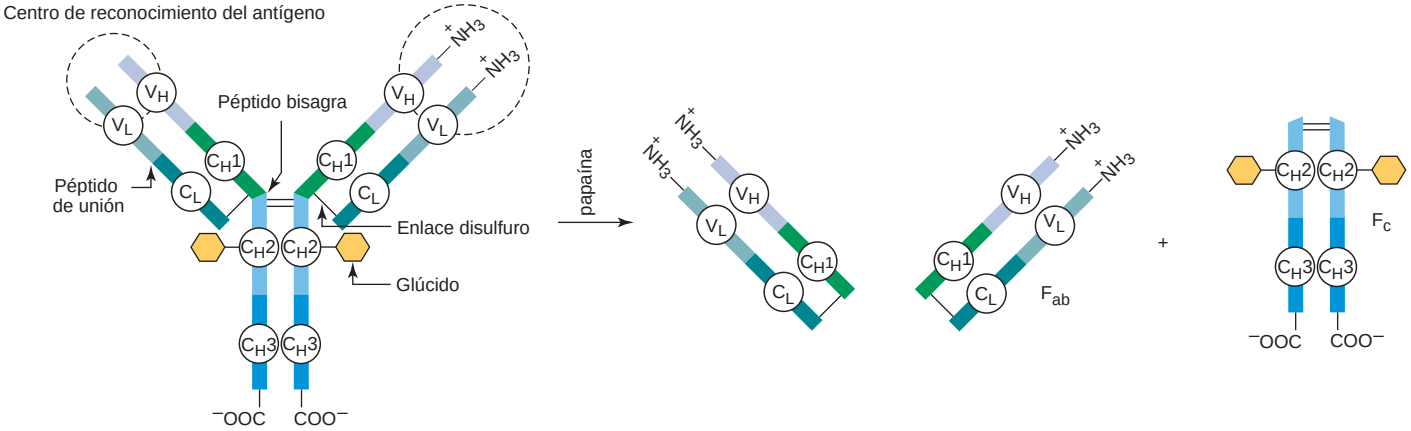


FIGURA 9.8
Hidrólisis de la IgG en dos fragmentos F_{ab} y uno F_c por el enzima proteolítico papaína.

del antígeno, se producen pequeños cambios conformacionales en el dominio V_L–V_H, lo que indica la existencia de un mecanismo de "encaje inducido" en la asociación del antígeno al anticuerpo. (6) La fijación del antígeno a los dominios V_L–V_H induce cambios conformacionales entre el dominio de fijación y dominios distantes del anticuerpo. Estos movimientos alostéricos alteran la afinidad de fijación de los centros efectores de los dominios constantes, tal como el de la fijación de la proteína del complemento C1q al dominio C_H2–C_H2 (véase Apli. Clín. 9.1).

Genética de las inmunoglobulinas

Las regiones V y C de las cadenas L y H están especificadas por genes distintos. Existen cuatro únicos genes que codifican los dominios C de la cadena H de los anticuerpos de la clase IgG. Cada uno de dichos genes codifica una región constante completa, de modo que contienen información para todos los aminoácidos de las cadena H, con excepción de la secuencia de la región V_H. Estos cuatro genes se denominan genes gamma (γ), es decir, γ_1, γ_2, γ_3 y γ_4, que dan lugar a los **isotipos de IgG**: IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4. La Figura 9.9 muestra las secuencias de aminoácidos de tres proteínas de los genes γ. Entre las secuencias de estos genes existe un 95% de homología.

Es probable que un gen primitivo codificara una única secuencia de plegamiento de unos 110 aminoácidos, y que **duplicaciones génicas** originaran las tres unidades repetitivas dentro del mismo gen γ de la cadena H de la IgG. Las muta-

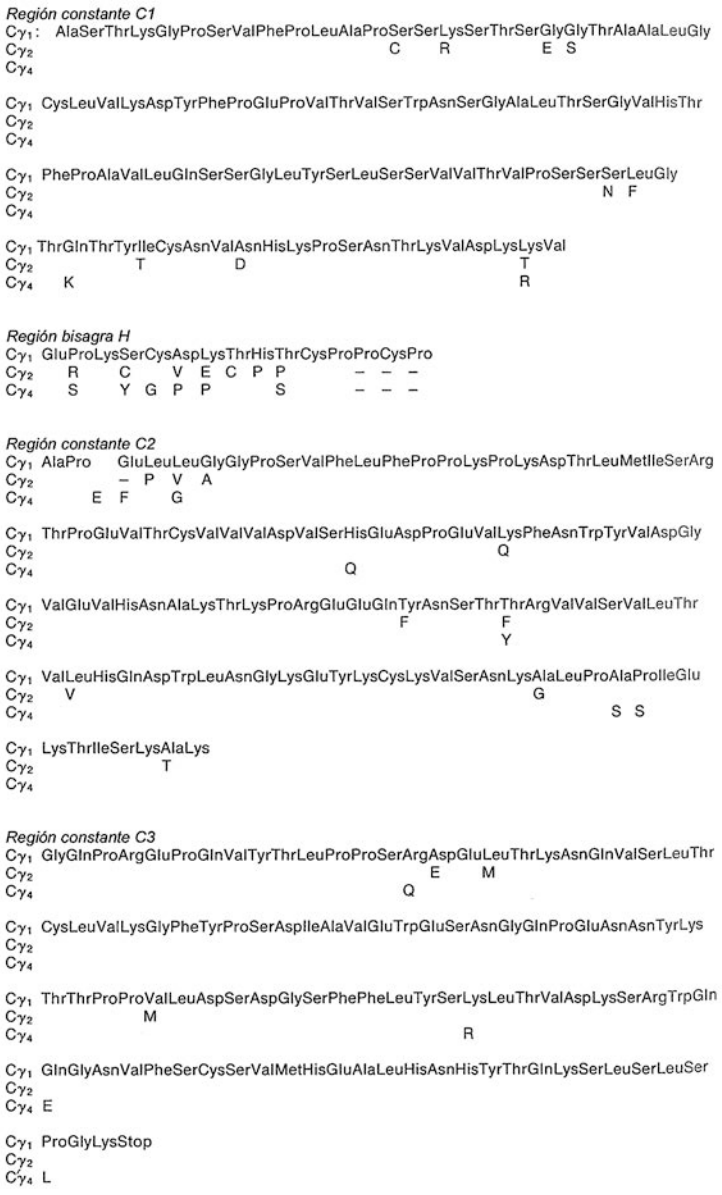


FIGURA 9.9
Secuencia de aminoácidos correspondiente a las regiones constantes de las cadenas pesadas de los genes γ_1, γ_2 y γ_4 de la cadena pesada de la IgG.
Se muestran los dominios de la región constante C_H1, de la región bisagra H, de la región constante C_H2 y de la región constante C_H3. Para γ_1 se da la secuencia completa, y las diferencias en aminoácidos entre ésta y las secuencias γ_2 y γ_4 se señalan mediante el código de una letra para los aminoácidos. La línea a trazos indica la ausencia de un aminoácido en una posición correlacionada con la secuencia de γ_1, a fin de alinear las secuencias de forma que muestren la máxima homología.
Secuencia de la cadena γ_1 de Ellison, J. W., Berson, B. J. y Hood, L. E. Nucleic Acids Res. *10:4071, 1982; y secuencias de los genes γ_2 y γ_4 de Ellison, J. y Hood, L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA *79:1984, 1982.*

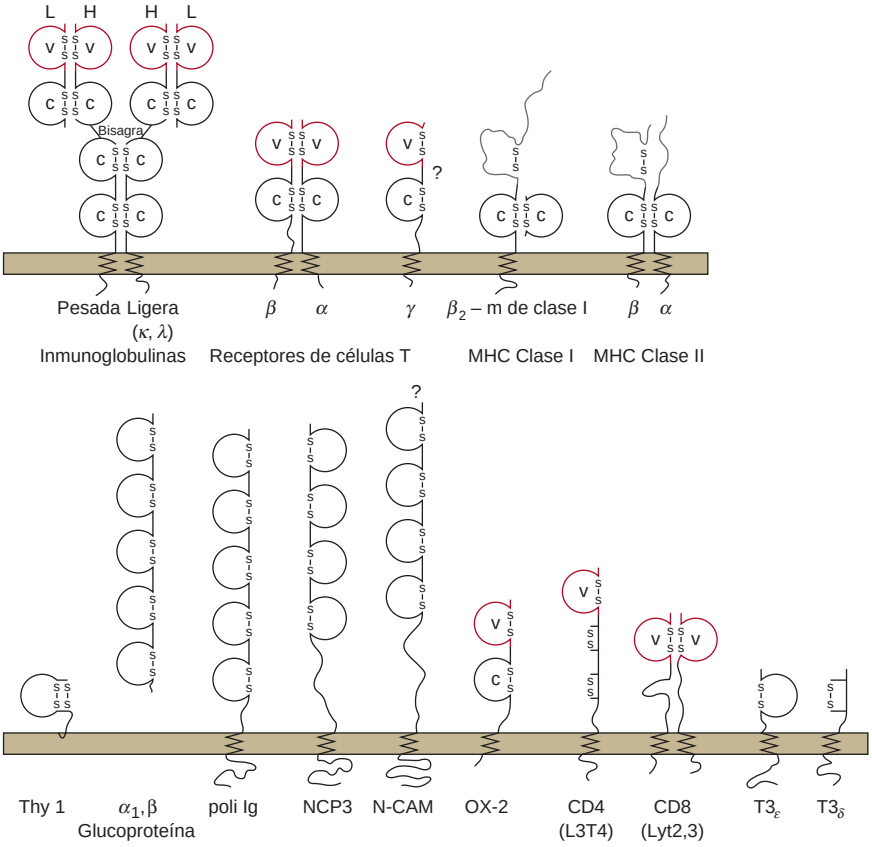


FIGURA 9.10
Representación esquemática de las estructuras de los dominios de las inmunoglobulinas en distintas proteínas de esta superfamilia génica. Las proteínas que se presentan incluyen las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas; receptores de células T; proteínas de clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC); proteínas secundarias de las células T, implicadas en el reconocimiento de la clase I (CD8) y clase II (CD4) del MHC, y posiblemente en la formación de canales iónicos; un receptor responsable del transporte de ciertas clases de inmunoglobulinas a través de las membranas mucosas (poli-Ig); la β_2-microglobulina, que se asocia con moléculas de la Clase I; una proteína plasmática humana de función desconocida (α_1/β-glucoproteína); dos moléculas de función desconocida con una distribución tisular que incluye tanto linfocitos como neuronas (Thy-1, OX-2); y dos moléculas específicas del cerebro, la molécula adhesiva de células neuronales (N-CAM) y la proteína neurocitoplasmática 3 (NP3).
Con permiso de Hunkapiller, T. y Hood, L. Nature *323:15, 1986.*

ciones modificaron las secuencias individuales, de modo que ya no existe la correspondencia exacta entre las secuencias. Sin embargo, cada uno de los plegamientos de la inmunoglobulina posee una longitud similar y un patrón de plegamiento parecido, estabilizado por un enlace cistina. En un momento posterior de la evolución, las duplicaciones génicas dieron lugar a los múltiples genes (γ_1, γ_2, γ_3 y γ_4) que codifican las regiones constantes de las secuencias de la clase IgG.

El plegamiento de la inmunoglobulina es una estructura terciaria que se encuentra en una gran familia de proteínas con papeles funcionales diferentes

El plegamiento de la inmunoglobulina se encuentra en un gran número de proteínas no inmunitarias que desempeñan funciones muy diversas. En base a su homología estructural, se agrupan en una **superfamilia de proteínas** (Figura 9.10). Por ejemplo, las proteínas de la Clase I del complejo principal de histocompatibilidad pertenecen a esta superfamilia, y presentan estructuras con plegamiento de la inmunoglobulina formadas por dos hojas β antiparalelas apiladas que encierran un espacio interno ocupado principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Dos cisteínas de la estructura forman un puente disulfuro que une las hojas β enfrentadas. Los factores de transcripción NF-κB y p53 también contienen un plegamiento de la inmunoglobulina. Se puede especular que la duplicación génica a lo largo de la evolución condujo a la distribución del plegamiento estructural entre proteínas funcionalmente distintas.

9.3 PROTEÍNAS CON UN MECANISMO CATALÍTICO COMÚN: SERINA PROTEASAS

Las **serina proteasas** constituyen una familia de enzimas que en su sitio de fijación de sustrato utilizan un residuo de serina activado de forma especial para hidrolizar catalíticamente enlaces peptídicos. Esta serina puede ser caracterizada mediante una reacción irreversible entre el grupo hidroxilo de su cadena lateral y el diisopropilfluorofosfato (DFP) (Figura 9.11). De todas las serinas presentes en la proteína, úni-

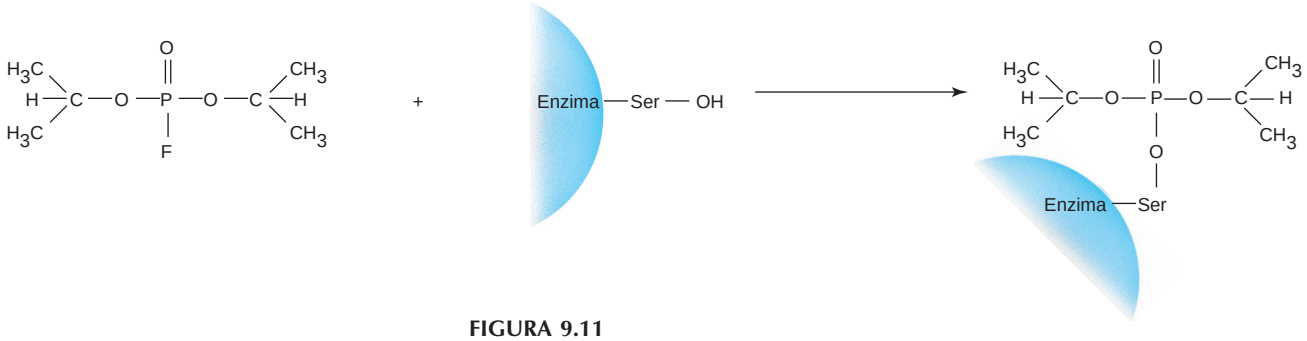


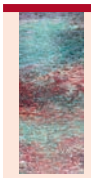
FIGURA 9.11
Reacción del diisopropilfluorofosfato (DFP) con la serina del sitio activo de una serina proteasa.

camente la serina catalíticamente activa reacciona con el DFP para formar un éster fosfato.

Los enzimas proteolíticos se clasifican según su mecanismo catalítico

Los enzimas proteolíticos se clasifican de acuerdo con su mecanismo catalítico. Junto a las serina proteasas, otras clases de proteasas utilizan una cisteína (**cisteína-proteasas**), un aspartato (**aspartato-proteasas**) o iones metálicos (**metaloproteasas**) para llevar a cabo su función catalítica. Las proteasas que hidrolizan enlaces peptídicos en el interior de una cadena polipeptídica se clasifican como **endopeptidasas**, mientras que aquellas que hidrolizan los enlaces peptídicos de los aminoácidos situados en los extremos NH_2 o COOH se clasifican como **exopeptidasas**.

Las serina proteasas a menudo activan otras serina proteasas a partir de su forma precursora inactiva, denominada **zimógeno**, por rotura catalítica de un enlace peptídico específico. Las serina proteasas participan en procesos fisiológicos cuidadosamente controlados, tales como la coagulación de la sangre (véase Apli. Clín. 9.4), la fibrinólisis, la activación del complemento (véase Apli. Clín. 9.1), la



APLICACIÓN CLÍNICA 9.4

Formación de fibrina en el infarto de miocardio y acción del activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA)

La coagulación es un proceso enzimático en cascada en el cual múltiples serina proteasas inactivas (zimógenos) son activadas catalíticamente por otras serina proteasas de un modo escalonado (la ruta de la coagulación se describe en el Capítulo 23). Tales procesos múltiples de activación que generan productos catalíticos dan lugar a una amplificación espectacular de la señal inicial de la ruta. El producto final de la ruta de coagulación es un coágulo de fibrina entrecruzada. Entre los zimógenos de las serina proteasas que intervienen en la coagulación se encuentran el factor II (protrombina), el factor VII (proconvertina), el factor IX (factor Christmas), el factor X (factor Stuart), el factor XI (precursor de la tromboplastina plasmática) y el factor XII (factor de Hageman). Los factores proteicos implicados en la ruta de la coagulación se designan mediante cifras romanas, siguiendo el orden en que fueron descubiertos, y no indican el orden de actuación dentro de la ruta. Tras la activación de la forma zimógeno, los enzimas activados se indican con el subíndice "a". De este modo, la protrombina se denomina Factor II, y su forma activada, la trombina, es también conocida como Factor II_a.

La principal función del proceso de coagulación es mantener la integridad del sistema circulatorio cerrado tras una herida vascular. Sin embargo, este proceso puede estar activado de forma peligrosa en el infarto de miocardio, causando una deficiencia en el flujo de sangre al músculo cardíaco. Cada año aproximadamente 1,5 millones de individuos padecen ataques cardíacos, que originan 600 000 muertes. En la sangre existe una ruta fibrinolítica que degrada los coágulos de fibrina. Esta ruta utiliza también zimógenos que son activados a serina proteasas. La reacción final es la activación de plasmina, una serina proteasa. La plasmina actúa directamente sobre la fibrina, catalizando la degradación del coágulo. El activador tisular del plasminógeno (t-PA) es uno de los activadores del plasminógeno que forma plasmina activa a partir del plasminógeno. Mediante tecnología de clonación génica (véase Capítulo 7) se ha producido t-PA recombinante (rt-PA). Estudios clínicos muestran que la administración de rt-PA inmediatamente después de un infarto de miocardio ayuda de forma significativa a la recuperación. Otros activadores del plasminógeno, como la uroquinasa y la estreptoquinasa, también son efectivos.

The GUSTO investigators (autores). An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 329:673, 1993; International Study Group (autores). In hospital mortality and clinical course of 20,891 patients with suspected acute myocardial infarction randomized between alteplase and streptokinase with or without heparin. *Lancet* 336:71, 1990; y Gillis, J. C., Wagstaff, A. J. y Goa, K. L. Alteplase. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in acute myocardial infarction. *Drugs* 50:102, 1995.

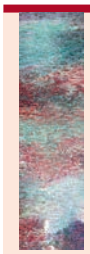
TABLA 9.2 Algunas serina proteasas y sus papeles bioquímicos y fisiológicos

Proteasa	*Acción*	*Posible enfermedad por deficiencia o malfuncionamiento*
Calicreína plasmática Factor XIIa Factor XIa Factor IXa Factor VIIa Factor Xa Factor IIa (trombina) Proteína C activada	Coagulación (Apli. Clín. 9.4)	Infarto cerebral (apoplejía), infarto coronario, trombosis, trastornos hemorrágicos
Factor C1r Factor C1s Factor D Factor B C3 convertasa	Complemento (Apli. Clín. 9.1)	Inflamación, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes
Tripsina Quimotripsina Elastasa (pancreática) Enteropeptidasa	Digestión	Pancreatitis
Uroquinasa activadora del plasminógeno Activador tisular del plasminógeno Plasmina	Fibrinólisis, migración celular, embriogénesis, menstruación	Trastornos de coagulación, metástasis tumoral (Apli. Clín. 9.5)
Calicreínas tisulares	Activación hormonal	
Acrosina	Fertilización	Infertilidad
Subunidad α del factor de crecimiento neuronal Subunidad γ del factor de crecimiento neuronal	Activación del factor de crecimiento	
Elastasa de granulocitos Catepsina G Quimasas de mastocitos Triptasas de mastocitos	Degradación extracelular de proteínas y péptidos, función celular de los mastocitos	Inflamación, respuesta alérgica

fertilización y la producción de hormonas (Tabla 9.2). Las activaciones de proteínas catalizadas por serina proteasas son ejemplos de "proteólisis limitada", ya que únicamente se hidrolizan de manera específica uno o dos de los centenares de enlaces peptídicos presentes en el sustrato proteico. No obstante, en condiciones desnaturalizantes, estos mismos enzimas hidrolizan múltiples enlaces peptídicos, dando así lugar a la digestión de péptidos, proteínas, e incluso de sí mismos (autólisis). Se cree que diversas enfermedades tales como enfisemas, artritis, trombosis, metástasis cancerosas (Apli. Clín. 9.5) y algunas formas de hemofilia provienen de la ausencia de regulación de serina proteasas específicas.

Las serina proteasas presentan una notable especificidad por el sitio de hidrólisis del enlace peptídico

Muchas serina proteasas muestran preferencia por la hidrólisis de enlaces peptídicos adyacentes a una clase particular de aminoácido. Así, la tripsina rompe preferentemente los enlaces peptídicos situados a continuación de aminoácidos básicos, tales como la arginina y la lisina, mientras que la quimotripsina hidroliza los enlaces peptídicos que se encuentran a continuación de aminoácidos grandes de carácter hidrofóbico tales como el triptófano, la fenilalanina, la tirosina o la leucina. La elastasa rompe enlaces peptídicos situados a continuación de aminoácidos hidrofóbicos pequeños tales como la alanina. Una serina proteasa puede ser clasificada como parecida a la tripsina si muestra preferencia por la rotura de enlaces peptídicos de arginina o lisina, o parecida a la quimotripsina si prefiere romper enlaces



APLICACIÓN CLÍNICA 9.5
Participación de las serina proteasas en la metástasis celular tumoral

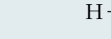
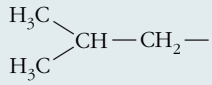
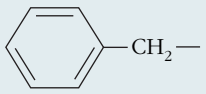
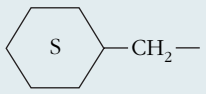
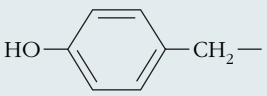
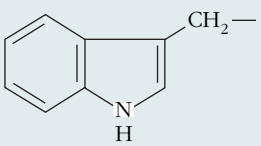
Se cree que en la metástasis de las células cancerosas se requiere la presencia de la serina proteasa uroquinasa. La metástasis es el proceso por el cual una célula cancerosa abandona un tumor primario y migra a través de los sistemas circulatorio o linfático hacia un nuevo tejido u órgano en donde inicia el crecimiento de un tumor secundario. El incremento en la síntesis de uroquinasa se ha correlacionado con un aumento de la capacidad de muchos tumores de producir metástasis. La uroquinasa activa el plasminógeno en plasmina. El plasminógeno se encuentra localizado de forma ubicua en el espacio extracelular, y su activación en plasmina puede originar la degradación catalítica de las proteínas de la matriz extracelular, a través de la cual pueden migrar las células tumorales implicadas en metástasis. La plasmina puede a su vez activar la procolagenasa en colagenasa, promoviendo la degradación del colágeno en la membrana basal que rodea los capilares y el sistema linfático. Tal inducción de la actividad proteolítica degradativa por la uroquinasa secretada por las células tumorales permite a éstas invadir sus tejidos diana y formar tumores secundarios.

Dano, K., Andreasen, P. A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L. S. y Skriver, L. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44:139, 1985; Yu, H. y Schultz, R. M. Relationship between secreted urokinase plasminogen activator activity and metastatic potential in murine B16 cells transfected with human urokinase sense and antisense genes. *Cancer Res.* 50:7623, 1990; y Fazioli, F. y Blasi, F. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new targets for anti-metastatic therapy? *Trends Pharmacol. Sci.* 15:25, 1994.

peptídicos de aminoácidos hidrofóbicos grandes, o parecida a la elastasa si corta los enlaces de aminoácidos con grupos de cadena lateral pequeños, tales como la alanina. La especificidad por un cierto tipo de aminoácido indica únicamente su preferencia relativa. La tripsina puede también hidrolizar enlaces peptídicos situados a continuación de aminoácidos hidrofóbicos, si bien a una velocidad mucho menor que la que presenta para los aminoácidos básicos. Así, la especificidad para hidrolizar el enlace peptídico de un tipo particular de aminoácido puede no ser absoluta, por lo que la mejor forma de describir la especificidad de una proteasa es hacerlo en función de las dianas más probables. Cada uno de los sitios potenciales de hidrólisis dentro de una proteína no presenta la misma susceptibilidad. La tripsina hidroliza cada uno de los enlaces peptídicos en los que interviene una arginina, dentro de un sustrato proteico particular, a distintas velocidades catalíticas, y algunos de estos enlaces puede requerir un cambio conformacional para resultar accesibles.

Se han llevado a cabo estudios detallados sobre la especificidad de las serina proteasas hacia un determinado enlace peptídico empleando sustratos sintéticos de longitud inferior a 10 aminoácidos (Tabla 9.3). Dado que estos sustratos son significativamente menores que los sustratos naturales, sólo interaccionan con el sitio catalítico (sitio de unión primario S_1, véase más adelante) y se dice que están **dirigidos al sitio activo**. Estudios llevados a cabo con sustratos pequeños o con inhibidores indican que el sitio de hidrólisis está flanqueado, en ambas direcciones, por aproximadamente cuatro aminoácidos, los cuales pueden unirse al enzima e influir sobre la

TABLA 9.3 Reactividad de la α-quimotripsina y la elastasa frente a sustratos con diferentes estructuras

Estructura	*Variación en el grupo de la cadena lateral del sitio S_1 (quimotripsina)*	*Reactividad relativa*[a]
Glicilo		1
Leucilo		$1{,}6 \times 10^4$
Metionilo		$2{,}4 \times 10^4$
Fenilalanilo		$4{,}3 \times 10^6$
Hexahidrofenilalanilo		$8{,}2 \times 10^6$
Tirosilo		$3{,}7 \times 10^7$
Triptofanilo		$4{,}3 \times 10^7$
Variación en la longitud de la cadena (hidrólisis de la amida N terminal de la alanina por elastasa)[b]		
Ac-Ala-NH_2		1
Ac-Pro-Ala-NH_2		$1{,}4 \times 10^1$
Ac-Ala-Pro-Ala-NH_2		$4{,}2 \times 10^3$
Ac-Pro-Ala-Pro-Ala-NH_2		$4{,}4 \times 10^5$
Ac-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-NH_2		$2{,}7 \times 10^5$

[a] Calculada a partir de valores de k_{cat}/K_m para ésteres metilo de *N*-acetil aminoácidos con sustratos de la quimotripsina.

[b] Calculada a partir de valores de k_{cat}/K_m en Thompson, R. C. y Blout, E. R. *Biochemistry* 12:57, 1973.

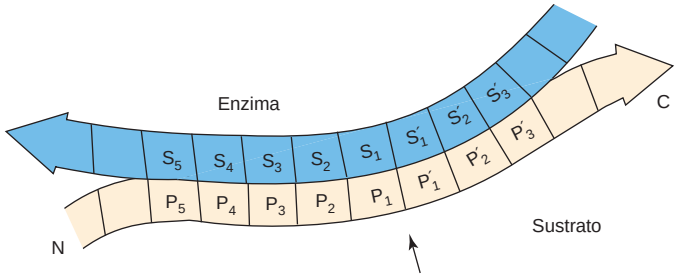


FIGURA 9.12
Diagrama esquemático de la unión de un sustrato polipeptídico al sitio de unión de un enzima proteolítico.
P_5–P_5' son aminoácidos del sustrato que se unen a los subsitios S_5–S_5' del enzima. La hidrólisis peptídica catalizada tiene lugar entre P_1–P_1' (flecha). El sentido NH_2-terminal en la cadena polipeptídica del sustrato se indica mediante una N, y el COOH-terminal con una C.
Adaptado de L. Polgar, en A. Neuberger y K. Brocklehurst (Eds.), Hydrolytic enzymes. *Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 174.*

reactividad del enlace peptídico que va a ser hidrolizado. Los dos aminoácidos del sustrato que contribuyen al enlace hidrolizable se designan **P_1—P_1'**. Así, en los sustratos de los enzimas de tipo tripsina, P_1 será lisina o arginina, y en los sustratos de enzimas de tipo quimotripsina, P_1 será un aminoácido hidrofóbico. Los otros residuos que interaccionan en el sustrato se denominan P_4—P_2 los situados del lado NH_2-terminal de P_1—P_1' y P_2'—P_4' los del lado COOH-terminal. Así, los residuos del sustrato que interaccionan con el **sitio activo extendido** de la serina proteasa serán P_4—P_3—P_2—P_1—P_1'—P_2'—P_3'—P_4'. Las regiones complementarias del enzima que se unen a los aminoácidos del sustrato se denominan subsitios **S_4—S_4'** (Figura 9.12). Las **interacciones secundarias** con el sustrato, que se dan fuera de S_1—S_1', son las que determinan en última instancia la especificidad de una proteasa hacia un sustrato proteico en particular. Así, la serina proteasa que interviene en la coagulación, el Factor Xa, corta únicamente el enlace peptídico de una determinada arginina en la protrombina activándola a trombina. Las interacciones de los residuos $P_4 \cdots P_4'$ del sustrato con los subsitios de unión $S_4 \cdots S_4'$ del enzima son de tipo no covalente. El sustrato interacciona con el sitio de unión del enzima, formando una estructura de hoja β extendida entre las cadenas polipeptídicas del enzima y del sustrato, lo que sitúa el enlace peptídico a hidrolizar dentro de S_1—S_1' (Figura 9.13).

Las serina proteasas se sintetizan en forma de zimógeno

Las serina proteasas se sintetizan en una forma inactiva denominada zimógeno, la cual requiere una proteólisis limitada para dar lugar al enzima activo. Las serina proteasas

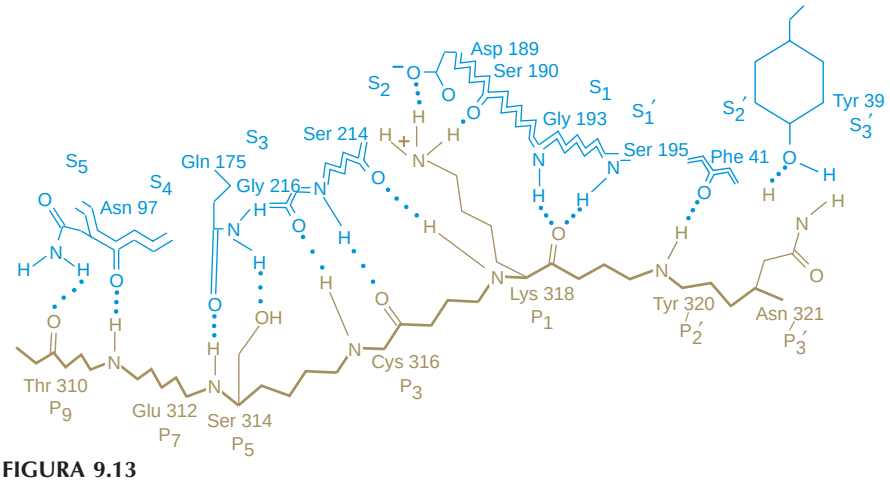


FIGURA 9.13
Diagrama esquemático de la unión del inhibidor pancreático de la tripsina al tripsinógeno, según datos de difracción de rayos X.
La región del tripsinógeno que contiene el sitio de unión adopta en el complejo con el inhibidor una conformación parecida a la de la tripsina activa. Se cree que el inhibidor se une al sitio de fijación del enzima activo de forma similar al sustrato. No se pueden obtener estructuras de rayos X de un complejo natural enzima–sustrato debido a que el sustrato es hidrolizado a una velocidad superior al tiempo empleado en el experimento de difracción de rayos X (véase p. 148). Obsérvese que el inhibidor posee una conformación extendida, de forma que los aminoácidos P_9, P_7, P_5, P_3, P_1–P_3' interaccionan con los subsitios de unión S_5–S_3'. El enlace potencialmente hidrolizable en el inhibidor se encuentra entre P_1–P_1'.
Adaptado de Bolognesi, M., Gatti, B., Menegatti, E., Guarneri, M. Papamokos, E. y Huber, R. J. Mol. Biol., *162:839, 1983.*

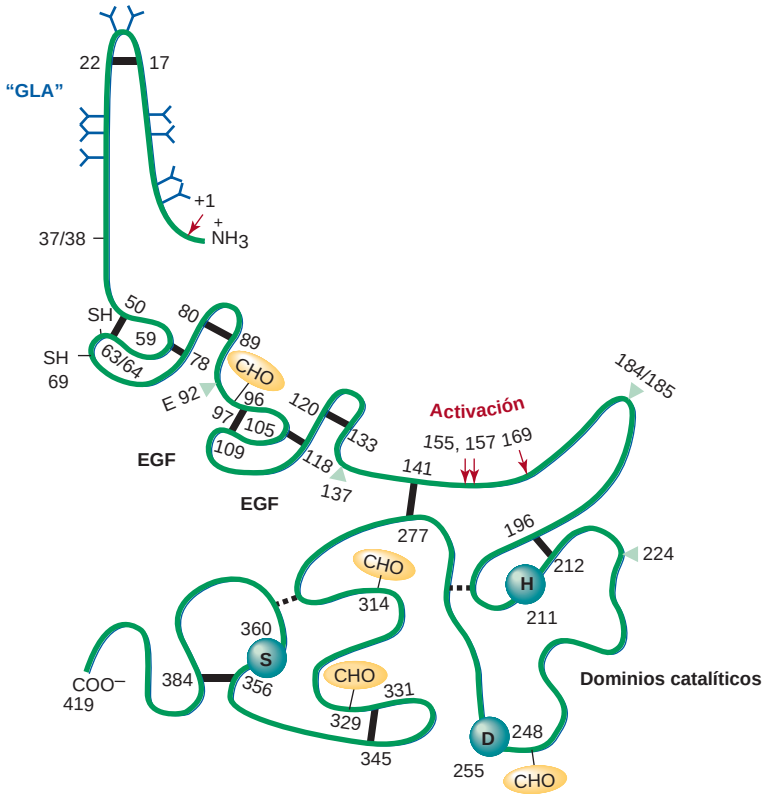


FIGURA 9.14
Esquema de la estructura en multidominios de la proteína C.
"GLA" se refiere a los residuos de γ-carboxiglutámico (indicados por los signos [Y]) del dominio NH_2-terminal; los puentes disulfuro se señalan con líneas gruesas, EGF indica la posición de los dominios del factor tipo crecimiento epidérmico, y CHO muestra las posiciones donde los residuos de azúcares se unen a la cadena polipeptídica. Los sitios de rotura proteolítica que conducen a la activación catalítica se indican mediante flechas. La secuencia de aminoácidos se numera desde el extremo NH_2, y los residuos de serina, histidina y aspartato del sitio catalítico se señalan mediante las abreviaturas de una letra, S, H y D, respectivamente.
Adaptado de una figura en G. L. Long, J. Cellular Biochem., *33:185, 1987.*

que intervienen en la coagulación son sintetizadas en las células hepáticas y secretadas a la sangre para su posterior activación por otras serina proteasas tras una lesión vascular. Las formas de zimógeno se suelen designar con el sufijo *-ógeno* a continuación del nombre del enzima; el zimógeno de la tripsina se denomina tripsin*ógeno*, y el de la quimotripsina quimotripsin*ógeno*. En algunos casos, el zimógeno recibe el nombre de **proenzima**; la forma zimógeno de la trombina se designa protrombina.

Diversas serina proteasas plasmáticas se secretan en forma de zimógenos compuestos por **múltiples dominios distintos**. La proteína C, que interviene en una ruta fibrinolítica de la sangre, posee cuatro dominios distintos (Figura 9.14). El dominio NH_2-terminal contiene un derivado de aminoácido, el **ácido γ-carboxiglutámico** (Figura 9.15), el cual se forma enzimáticamente por carboxilación de los residuos de glutámico, a través de una reacción dependiente de la vitamina K (véanse pp. 1047 y 1146). Los ácidos γ-carboxiglutámicos quelan iones calcio y forman parte de un sitio de unión a membranas. El segmento COOH-terminal contiene los dominios catalíticos. La activación de estos zimógenos requiere una proteólisis específica fuera de los dominios catalíticos (Figura 9.14) y está controlada por la unión de los nueve residuos de ácido γ-carboxiglutámico del extremo NH_2-terminal a un sitio de la membrana que promueve su activación. Esta unión se realiza a través de iones calcio.

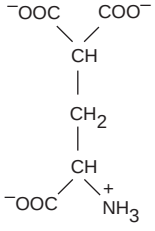


FIGURA 9.15
Estructura del ácido γ-carboxiglutámico (abreviatura: Gla), un derivado de aminoácido presente en el dominio NH_2-terminal de muchas proteínas de la coagulación.

Existen inhibidores proteicos específicos de serina proteasas

La selección evolutiva de esta familia de enzimas para su participación en procesos fisiológicos requiere la evolución paralela de factores de control. Proteínas específicas inhiben la actividad de las serina proteasas una vez que el papel fisiológico de

éstas ha concluido (Tabla 9.4). De este modo, la coagulación está limitada al lugar en que se produce la lesión vascular, y la activación del complemento conduce únicamente a la lisis de las células que contienen antígenos extraños. La incapacidad de controlar estas proteasas, que puede deberse a una deficiencia en un inhibidor específico, puede tener consecuencias no deseadas, tales como la formación de trombos en el infarto de miocardio y en la apoplejía, o las reacciones del complemento incontroladas en enfermedades autoinmunes. A lo largo de la evolución se han producido inhibidores naturales de las serina proteasas, denominados **serpinas** (de *ser*ina *p*roteasa *in*hibidores). Esta familia de inhibidores se encuentra en animales que poseen proteasas, pero, sorprendentemente, también se encuentra en plantas que carecen de ellas.

Las serina proteasas tienen relaciones estructura–función similares

Las complejas relaciones entre la estructura y la función fisiológica de las serina proteasas requieren el análisis de un cierto número de observaciones. (1) Sólo un residuo de serina es catalíticamente activo y participa en la rotura del enlace peptídico. La tripsina bovina contiene 34 serinas, pero únicamente una de ellas es catalíticamente activa o capaz de reaccionar con el inhibidor DFP (véase Figura 9.11). (2) Los estudios de difracción de rayos X y de homología entre las secuencias de aminoácidos demuestran que hay una histidina y un aspartato, que se encuentran siempre asociados con la serina activada en el sitio catalítico. Teniendo en cuenta su posición en la secuencia del quimotripsinógeno, estos tres residuos invariables del sitio activo de las serina proteasas se denominan Ser 195, His 57 y Asp 102. Esta numeración, basada en la numeración de la secuencia del quimotripsinógeno, se utiliza generalmente para identificar dichos residuos, independientemente de su posición exacta en la estructura primaria de una determinada serina proteasa. (3) Las serina proteasas eucarióticas tienen entre sí una elevada similitud, tanto en la secuencia de aminoácidos como en su estructura. (4) Los genes que codifican las serina proteasas están organizados de manera similar (Figura 9.16). En los genes eucarióticos, los exones corresponden a segmentos del DNA genómico que se combinan para dar el RNA mensajero final que lleva la información sobre la proteína. Los exones están separados por intrones, que son eliminados del RNA y no están, por lo tanto, presentes en el RNA mensajero final (véase p. 225). Los **patrones exón–intrón** de las serina proteasas muestran que cada uno de los aminoácidos esenciales desde el punto de vista catalítico (Ser 195, His 57 y Asp 102) se encuentran en exones distintos. La histidina y la serina catalíticamente esenciales se encuentran prácticamente adyacentes al límite de

TABLA 9.4 Algunas proteínas humanas que inhiben serina proteasas

Inhibidor	*Acción*
Inhibidor de α_1-proteinasa	Inhibe las proteasas tisulares, incluida la elastasa de neutrófilos; la deficiencia conduce a enfisema pulmonar
α_1-Antiquimotripsina	Inhibe proteasas con especificidad del tipo quimotripsina de neutrófilos, basófilos y mastocitos, incluida la catepsina G y la quimasa
Inhibidor de inter-α-tripsina	Inhibe un amplio espectro de actividades serina proteasa plasmáticas
α_2-Antiplasmina	Inhibe la plasmina
Antitrombina III	Inhibe la trombina y otras proteasas de la coagulación
Inhibidor de C_1	Inhibe las reacciones del complemento
α_2-Macroglobulina	Inhibidor general de proteasas
Proteasa nexina I	Inhibe la trombina, la uroquinasa y la plasmina
Proteasa nexina II	Inhibe a las serina proteasas asociadas al factor de crecimiento; es idéntica al dominio NH_2-terminal de la proteína amiloide secretada en la enfermedad de Alzheimer
Inhibidor I del activador del plasminógeno	Inhibe activadores del plasminógeno
Inhibidor II del activador del plasminógeno	Inhibe la uroquinasa activadora del plasminógeno

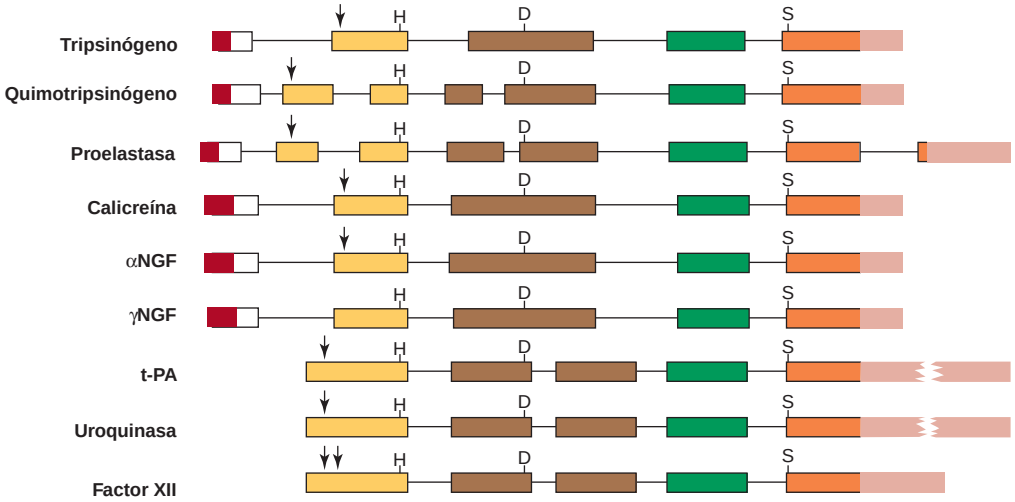


FIGURA 9.16
Organización de exones e intrones de genes que codifican serina proteasas.
El t-PA es el activador tisular del plasminógeno, y el NGF es el factor de crecimiento neuronal que contiene una estructura homóloga a la de una serina proteasa. Los exones se indican mediante recuadros, y los intrones mediante líneas entre aquéllos. La posición de los codones que corresponden a la serina, la histidina y el aspartato del sitio activo se señalan mediante las letras S, H y D, respectivamente. Los recuadros en color rojo de la izquierda muestran las regiones que codifican la región NH_2-terminal de la cadena polipeptídica (péptido señal), que es eliminado de la cadena previamente a la secreción de la proteína. Los recuadros claros de la derecha representan una fracción de la secuencia del gen que se transcribe en RNA mensajero (mRNA), pero que no se traduce en proteína. Las flechas muestran los codones de los residuos en que se da la activación proteolítica de los zimógenos.
Basado en una figura de D. M. Irvin, K. A. Roberts y R. T. Mac Gillivray. J. Mol. Biol. *200:31, 1988*

sus respectivos exones. La similitud en la organización de exones e intrones se da entre los diversos enzimas de la familia de las serina proteasas de las distintas especies eucarióticas. La homología interespecífica en la estructura génica de las serina proteasas apoya la idea de que estos enzimas han evolucionado a partir de un gen primitivo común. (5) La unidad catalítica de las serina proteasas presenta dos dominios estructurales de un tamaño aproximadamente igual. El sitio catalítico se encuentra en la frontera (hendidura) entre los dos dominios. (6) Las serina proteasas que actúan a través de la interacción directa con membranas poseen de forma característica un dominio adicional que proporciona a la proteína dicha función. (7) Los inhibidores y sustratos proteicos naturales de las serina proteasas se unen a través de un sitio específico extendido. (8) La especificidad de la unión a los inhibidores proteicos naturales es muy grande. La constante de unión de la tripsina al inhibidor pancreático de la tripsina es del orden de $10^{13}\ M^{-1}$, que supone una energía libre de unión de unas 18 kcal mol^{-1}. (9) Los inhibidores proteicos naturales suelen ser malos sustratos y para la actividad inhibidora del inhibidor se requiere la hidrólisis por la proteasa de un enlace peptídico del inhibidor. (10) Las serina proteasas se sintetizan en los eucariotas en forma de zimógenos, para permitir su producción y transporte en un estado inactivo hasta sus lugares de acción. (11) La activación de los zimógenos suele implicar hidrólisis por parte de otra serina proteasa. (12) Diversas serina proteasas sufren procesos de **autólisis** o autohidrólisis. Dichos procesos conducen en ocasiones a la rotura de enlaces peptídicos específicos y a la inducción de la actividad catalítica. En otras ocasiones, la autólisis conduce a la inactivación de la proteasa.

Homología de secuencia de aminoácidos en las serina proteasas

Gran parte de nuestros conocimientos iniciales sobre la familia de las serina proteasas se obtuvieron a partir de tripsina y quimotripsina purificadas de material bovino. Ello condujo a una nomenclatura útil pero no intuitiva, basada en el alineamiento de una secuencia determinada con la de la quimotripsina, para numerar y nombrar los residuos de otras serina proteasas. Como ya se dijo, los residuos catalíticamente esenciales son: Ser 195, His 57 y Asp 102. Las inserciones y deleciones de aminoácidos en la estructura primaria de otra serina proteasa se comparan con la numeración de los aminoácidos de la quimotripsina. El alineamiento se lleva a cabo mediante algoritmos que maximizan la homología de secuencia, con un alineamiento exacto de los residuos de serina, histidina y aspartato esenciales. Estos tres residuos

TABLA 9.5 Secuencias invariables encontradas alrededor de la serina (S) e histidina (H) catalíticamente esenciales

Enzima	*Secuencia (en negrita los residuos idénticos a la quimotripsina)*																								
	Residuos alrededor de la histidina catalíticamente esencial																								
Quimotripsina A	F	**H**	**F**	**C**	**G**	**G**	**S**	**L**	**I**	**N**	**E**	**N**	**W**	**V**	**V**	**T**	**A**	**A**	**H***	**C**	G	V	T	T	S	D
Tripsina	Y	**H**	**F**	**C**	**G**	**G**	**S**	**L**	**I**	**N**	S	Q	**W**	**V**	**V**	S	**A**	**A**	**H**	**C**	Y	K	S	G	I	Q
Elastasa pancreática	A	**H**	T	**C**	**G**	**G**	T	**L**	**I**	R	Q	**N**	**W**	**V**	M	**T**	**A**	**A**	**H**	**C**	V	D	R	E	L	T
Trombina	E	L	L	**C**	**G**	A	**S**	**L**	**I**	S	D	R	**W**	**V**	L	**T**	**A**	**A**	**H**	**C**	L	L	Y	P	P	W
Factor X	E	G	**F**	**C**	**G**	**G**	T	I	L	**N**	**E**	F	Y	**V**	L	**T**	**A**	**A**	**H**	**C**	L	H	Q	A	K	R
Plasmina	M	**H**	**F**	**C**	**G**	**G**	T	**L**	**I**	S	P	E	**W**	**V**	L	**T**	**A**	**A**	**H**	**C**	L	E	K	S	P	R
Calicreína plasmática	S	F	Q	**C**	**G**	**G**	V	**L**	V	**N**	P	K	**W**	**V**	L	**T**	**A**	**A**	**H**	**C**	K	N	D	N	Y	E
Tripsina de *Streptomyces*	–	–	–	**C**	**G**	**G**	A	**L**	Y	A	Q	D	I	**V**	L	**T**	**A**	**A**	**H**	**C**	V	S	G	S	G	N
Subtilisina	V	G	G	A	S	F	V	A	G	E	A	Y	N	T	D	G	N	G	**H**	G	T	H	V	A	G	T
	Residuos alrededor de la serina catalíticamente esencial																								
Quimotripsina A	**C**	**A**	**G**	**–**	**–**	**–**	A	S	**G**	**V**	**–**	**–**	**S***	**S**	**C**	**M**	**G**	**D**	**S***	**G**	**G**	**P**	**L**	**V**	
Tripsina	**C**	**A**	**G**	Y	**–**	**–**	L	E	**G**	G	K	**–**	D	**S***	**C**	Q	***G***	***D***	***S***	***G***	***G***	***P***	V	**V**	
Elastasa pancreática	**C**	**A**	**G**	**–**	**–**	**–**	G	N	**G**	**V**	R	**–**	**S***	G	**C**	Q	**G**	**D**	**S***	**G**	**G**	**P**	**L**	**H**	
Trombina	**C**	**A**	**G**	Y	K	P	G	E	**G**	K	R	G	D	A	**C**	E	**G**	**D**	**S***	**G**	**G**	**P**	F	**V**	
Factor X	**C**	**A**	**G**	Y	**–**	**–**	D	T	**Q**	P	E	**–**	D	A	**C**	Q	**G**	**D**	**S***	**G**	**G**	**P**	H	**V**	
Plasmina	**C**	**A**	**G**	H	**–**	**–**	L	A	**G**	G	T	**–**	D	**S***	**C**	Q	**G**	**D**	**S***	**G**	**G**	**P**	**L**	**V**	
Calicreína plasmática	**C**	**A**	**G**	Y	**–**	**–**	L	P	**G**	G	K	**–**	D	T	**C**	**M**	**G**	**D**	**S***	**G**	**G**	**P**	**L**	I	
Tripsina de *Streptomyces*	**C**	**A**	**G**	Y	**–**	P	D	T	**G**	G	V	**–**	D	T	**C**	Q	**G**	**D**	**S***	**G**	**G**	**P**	M	F	
Subtilisina	A	G	V	Y	S	T	Y	P	T	N	T	Y	A	T	L	N	**G**	T	**S***	M	A	S	P	H	

Fuente: Barrett, A. J, en: A. J. Barrett y G. Salvesen (Eds.), *Proteinase Inhibitors.* Amsterdam: Elsevier, 1986, p. 7.

son invariables en todas las serina proteasas y las secuencias que los rodean no varían entre las serina proteasas de la familia de la quimotripsina (Tabla 9.5).

También en procariotas se encuentran miembros de la familia de la quimotripsina. Así, las serina proteasas bacterianas de *Streptomyces griseus* y *Myxobacteria* 450 muestran homología estructural y funcional con la quimotripsina. A partir de bacterias se ha aislado una familia distinta de serina proteasas que no presentan homología estructural con la familia de la quimotripsina de mamíferos. La serina proteasa subtilisina, purificada a partir de *Bacillus subtilis*, hidroliza enlaces peptídicos y contiene una serina activada, junto a una histidina y un aspartato, en el sitio activo, si bien este sitio activo proviene de regiones estructurales de la proteína que no presentan homología de secuencia o de estructura con las serina proteasas del tipo quimotripsina. Esta serina proteasa es un ejemplo de **evolución convergente** de un mecanismo enzimático catalítico. Aparentemente, un gen completamente distinto evolucionó, tomando el mismo mecanismo catalítico que utiliza una serina en el sitio activo. Las estructuras primaria y terciaria son también distintas de las estructuras del tipo tripsina o quimotripsina.

Las estructuras terciarias de la familia tripsina de las serina proteasas son similares

La Ser 195 de la quimotripsina reacciona con el **diisopropilfluorofosfato (DFP)**, con una estequiometría enzima : DFP de 1:1 que inhibe al enzima. La estructura tridimensional de la quimotripsina pone de manifiesto que la Ser 195 está situada dentro de una cavidad interna, accesible a la interfase del disolvente. Los residuos His 57 y Asp 102 están orientados de manera tal que participan junto con la Ser 195 en el mecanismo catalítico (véase p. 447).

La determinación de la estructura por cristalografía de rayos X se ha llevado a cabo en un gran número de miembros de esta clase de proteínas (véase Tabla 9.6). Existen datos estructurales sobre las formas catalíticamente activas de los enzimas, de los zimógenos, de los mismos enzimas de diversas especies, de complejos enzima–inhibidor, y sobre un determinado enzima en distintas condiciones de temperatura o de disolvente. El análisis más completo que se conoce es el de la tripsina. Su estructura ha sido determinada por difracción de rayos X a una resolución superior a 1,7 Å. A esta resolución se pueden discriminar átomos que se encuentren a 1,3 Å, distancia próxima a la separación entre los átomos C═O en el grupo carbonilo (1,2 Å). Sin embargo, esta resolución no es uniforme a lo largo de toda la estructura de la trip-

TABLA 9.6 Estructuras de serina proteasas determinadas por cristalografía de rayos X

Enzima	*Fuente*	*Inhibidores*	*Resolución (Å)*
Quimotripsina[a]	Bovina	Sí[b]	1,67[c]
Quimotripsinógeno	Bovina	No	2,5
Elastasa	Porcina	Sí	2,5
Calicreína	Porcina	Sí	2,05
Proteinasa A	*S. griseus*	No	1,5
Proteinasa B	*S. griseus*	Sí	1,8
Proteinasa II	Rata	No	1,9
Tripsina[a]	Bovina	Sí[b]	1,4[c]
Tripsinógeno[a]	Bovina	Sí[b]	1,65[c]

[a] Estructura determinada independientemente por dos o más investigadores.

[b] Estructura obtenida sin inhibidor (estructura nativa) y con inhibidor. Los inhibidores empleados incluyen inhibidores de baja masa molecular (benzamidina, DFP y tosilo) e inhibidores proteicos (inhibidor pancreático de la tripsina bovina).

[c] La mayor resolución para esta molécula entre las múltiples determinaciones.

sina. Distintas regiones de la molécula muestran una tendencia distinta a ser localizadas en el espacio durante el tiempo en que se realiza el experimento de difracción de rayos X, y la posición de determinados átomos de la estructura no se puede definir con tanta exactitud como la de otros. El desorden estructural se hace particularmente evidente en aquellos residuos de la superficie de la molécula que no establecen contacto con otras moléculas vecinas. Los métodos de adquisición rápida de datos de rayos X (véase p. 148) también apoyan las fluctuaciones dinámicas observadas. La tripsina es globular, y está compuesta por dos dominios de tamaño aproximadamente igual (Figura 9.17) que no penetran uno en el otro. La estructura secundaria de la tripsina posee pocas hélices α, a excepción de la región COOH-terminal de la molécula. Predomina la estructura β, formando cada dominio un barril β "deformado". Las regiones que constituyen los bucles sobresalen de los extremos del barril y se presentan con una disposición casi simétrica por cada uno de los dos dominios plegados. Dichas estructuras en bucle se combinan para formar una región superficial del enzima que se extiende hacia el exterior, por encima del sitio catalítico. Estos bucles presentan una similitud estructural y funcional con las CDR de las inmunoglobulinas.

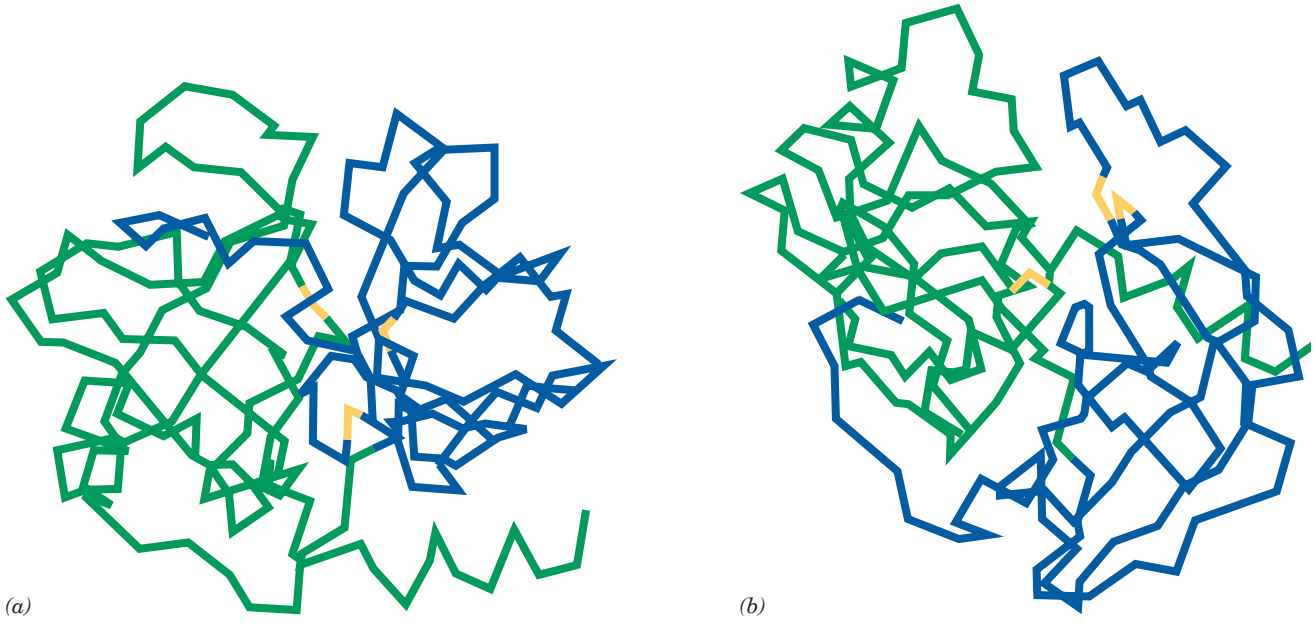


FIGURA 9.17
Dos vistas de la estructura de la tripsina que muestran la estructura terciaria de los dos dominios.
En amarillo se muestran la serina, la histidina y el aspartato del sitio activo.

TABLA 9.7 Superposición de las estructuras de un conjunto seleccionado de serina proteasas de la familia de la tripsina y comparación de la secuencia de aminoácidos resultante

Comparación	*Número de aminoácidos en la secuencia*		*Número de residuos estructuralmente equivalentes*	*Número de residuos químicamente idénticos*
	Proteasa 1	*Proteasa 2*		
Tripsina-elastasa	223	240	188	81
Tripsina-quimotripsina	223	241	185	93
Tripsina-proteasa de mastocitos	223	224	188	69
Tripsina-precalicreína	223	232	194	84
Tripsina-proteasa de *S. griseus*	223	180	121	25

Mediante una función matemática que compara la equivalencia estructural y permite la inserción y deleción de aminoácidos en una secuencia particular se pueden alinear las estructuras tridimensionales de las serina proteasas. En la Tabla 9.7 se compara la superponibilidad estructural con la homología de secuencia obtenida tras la superposición de las estructuras. Dicha tabla muestra el número total de aminoácidos y el número de éstos que, en cada una de las estructuras, son estadísticamente idénticos. Los aminoácidos topológicamente equivalentes tienen la misma relación en el espacio tridimensional, hasta el punto de que no pueden distinguirse uno del otro por difracción de rayos X. En la última columna se presenta el número de aminoácidos químicamente idénticos. En estos alineamientos estructurales, las regiones con mayor diferencia se sitúan en las regiones de los bucles de tipo CDR, los cuales se extienden desde los dominios en barril β para formar la región superficial sobre el sitio catalítico. Un cambio de aminoácidos en dichos bucles altera la **especificidad de unión macromolecular** de la proteasa. Por ejemplo, la estructura del bucle del Factor Xa es la que permite la unión específica de dicha proteasa a la protrombina. Las serpinas interaccionan con distintas proteasas según su afinidad con las estructuras en bucle. Las proteasas bacterianas relacionadas con la familia de serina proteasas eucarióticas contienen los dos mismos dominios, si bien carecen de la mayoría de las estructuras en bucle. Ello concuerda con el hecho de que las proteasas bacterianas no requieren interacciones tan complejas, así como con la observación de que las proteasas bacterianas no se sintetizan en forma de zimógenos.

Así, la familia de las serina proteasas constituye una serie de proteínas relacionadas estructuralmente que utilizan una serina catalíticamente activa. La estructura básica en dos dominios y los residuos catalíticamente esenciales se han mantenido durante la evolución, si bien las regiones responsables de interacciones secundarias (regiones en bucle) han variado para proporcionar a los distintos miembros de esta familia sus diversas especificidades hacia los sustratos proteicos, activadores e inhibidores, característicos de sus funciones fisiológicas.

9.4 PROTEÍNAS DE UNIÓN A DNA

En el DNA existen sitios de regulación a los que se unen proteínas que controlan la expresión génica (véase p. 350). Estos sitios contienen una secuencia de nucleótidos que forman un sitio de unión para proteínas reguladoras, conocidas como factores de transcripción. La secuencia de DNA específica, conocida como **elemento de unión del factor de transcripción**, suele ser inferior a 10 nucleótidos. Interacciones no covalentes entre el DNA y la proteína permiten a esta última reconocer la secuencia nucleotídica y unirla. Ello conlleva una gran selectividad, dado que el genoma humano posee unos 30 000 genes, cada uno con sus propias secuencias reguladoras. Si bien existen grandes lagunas en nuestro conocimiento acerca del mecanismo de regulación de la expresión génica por las proteínas, se han observado en las proteínas de unión al DNA algunos motivos estructurales comunes.

Los tres principales motivos estructurales de las proteínas de unión al DNA

A lo largo de la espiral helicoidal que forma una molécula de DNA en su forma más común (forma B) existen dos surcos, el mayor y el menor (Figura 9.18) (véase p. 38) a los que han de unirse las proteínas. Un motivo estructural común presente en un gran número de proteínas de unión a DNA es la **hélice-giro-hélice (HTH)**. Un HTH

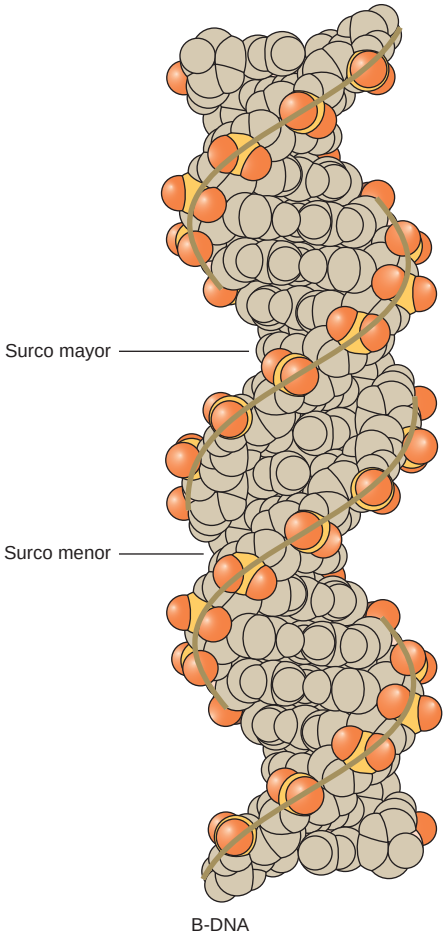


FIGURA 9.18
Modelo compacto del DNA en la conformación B, mostrando los surcos mayor y menor.
Reproducido con permiso de Rich, A. J., Biomol. Struct. Dyn. *1:1, 1983*

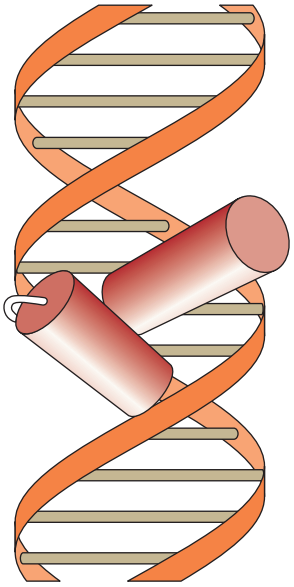


FIGURA 9.19
Unión de un motivo hélice–giro–hélice dentro del surco mayor del B-DNA.
La hélice de reconocimiento se dispone a través del surco mayor.
Adaptado de R. Schleif, Science *241:241, 1988.*

sitúa una de sus hélices α, denominada **hélice de reconocimiento**, a través del surco mayor, en donde residuos de las cadenas laterales de la hélice establecen interacciones no covalentes específicas con la secuencia de bases del DNA diana. La interacción a menudo induce distorsiones en la conformación del sitio de unión en el B-DNA que permiten establecer mejor las interacciones con la proteína. Se establecen interacciones no específicas entre la proteína y el esqueleto de azúcar–fosfato del DNA. La mayoría de las proteínas HTH se unen al DNA en forma de dímeros con lo que forman dos motivos hélice–giro–hélice por proteína reguladora activa. Las estructuras de rayos X muestran que estos dos motivos hélice–giro–hélice sobresalen de la estructura de cada dominio monomérico que se unen a dos giros adyacentes del surco mayor del DNA. La interacción dual producida por el dímero hace que sea posible una interacción proteína-DNA más fuerte y más específica que la que se podría conseguir con el monómero. Las proteínas diméricas son simétricas y las correspondientes secuencias de unión del DNA del elemento regulador son palíndromos (véase p. 72; Figuras 9.19-9.21).

El motivo del **dedo de zinc (zinc finger)** de algunas proteínas de unión al DNA contiene repeticiones de un motivo formado por un átomo de Zn^{2+} unido a las cadenas laterales de dos cisteínas y dos histidinas (Figura 9.22). En algunos casos, las histidinas pueden ser sustituidas por cisteínas. La estructura primaria del motivo contiene dos cisteínas muy cercanas, separadas por unos 12 aminoácidos de un segundo par de aminoácidos (histidina o cisteína) unidos a Zn^{2+}. Se ha deducido por ^{1}H-RMN la estructura tridimensional de un dedo de zinc (Figura 9.23). El motivo contiene un segmento de hélice α que puede unirse dentro del surco ma-

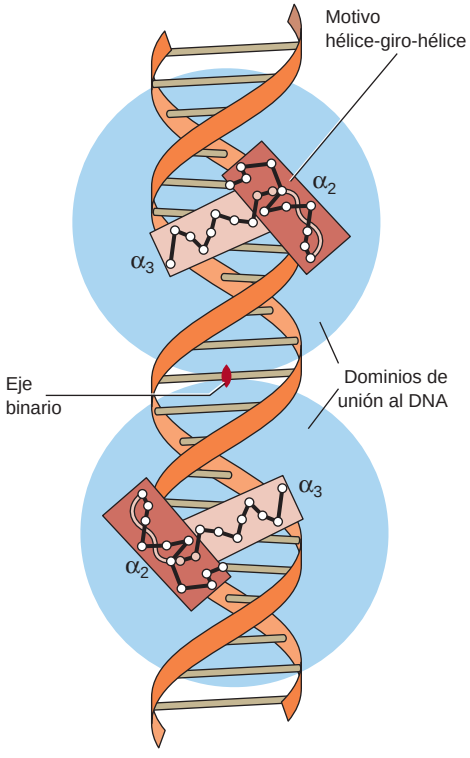


FIGURA 9.20
Asociación de una proteína de unión a DNA (dímero) con dos motivos hélice–giro–hélice dentro de surcos mayores en giros adyacentes del B-DNA.
Adaptado de R. Brennan y B. W. Matthews Trends. Biochem. Sci. *14:287, 1989.*

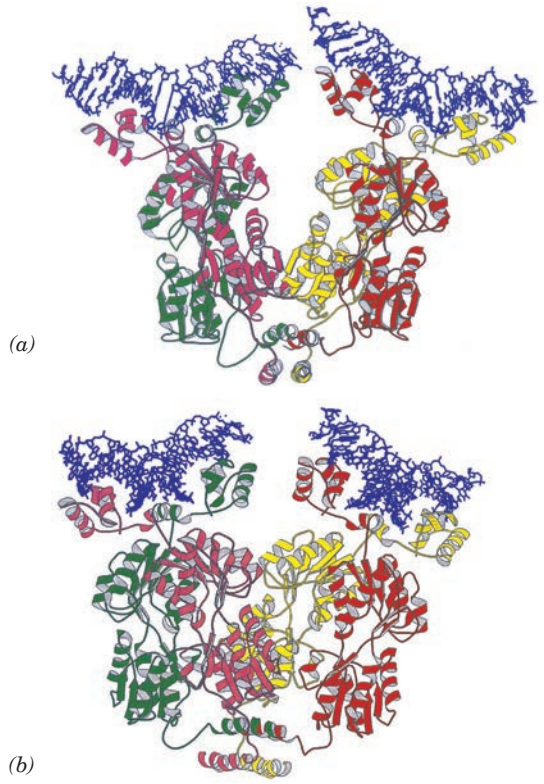


FIGURA 9.21
Estructura cristalográfica por rayos X del motivo hélice–giro–hélice de la proteína represora de *lac* asociada con su DNA diana.
(*a*) El represor es una proteína tetramérica; los monómeros están coloreados en verde y rojo (izquierda), y en rojo y amarillo (derecha). Los DNA diana están coloreados en púrpura (arriba). Las hélices de reconocimiento en el dímero del tetrámero se muestran interaccionando con los surcos mayores adyacentes de los DNA diana. Cada dímero del tetrámero interacciona con una secuencia diana consenso concreta (separada) presente en el DNA. (*b*) Otra vista del mismo tetrámero.
Reproducido con permiso de Lewis, M., Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G. y Lu, P. Science *271:1247, 1996. Copyright 1996 American Association for the Advancement of Science*

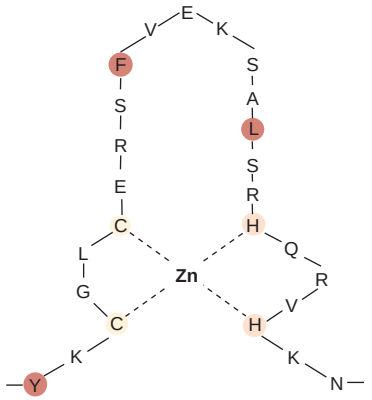
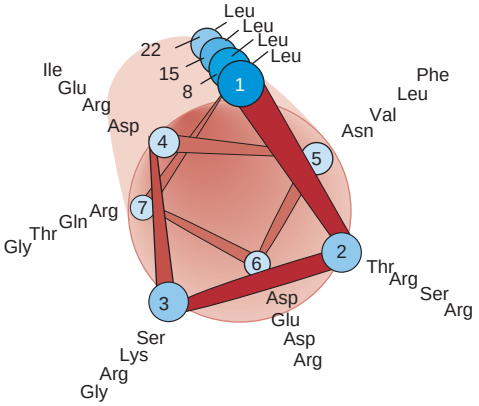


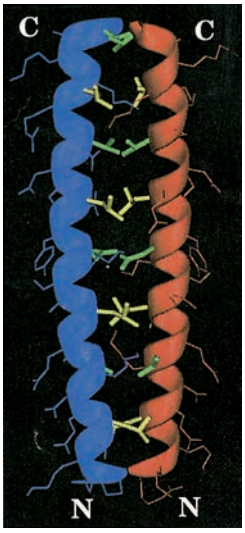
FIGURA 9.22
Secuencia primaria de un motivo dedo de zinc hallado en la proteína de unión a DNA Xfin de *Xenopus*.
Los aminoácidos invariables o muy conservados se indican mediante un círculo de color rojo.
Adaptado de M. S. Lee, G. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case y P .E. Wright Science *245:635, 1989.*

yor en el sitio diana del DNA y establecer interacciones específicas con la secuencia nucleotídica (véase p. 354.)

Un tercer motivo estructural que se encuentra en algunas de las proteínas de unión a DNA es la **cremallera de leucina**. Ésta se forma a partir de una región de hélice α que contiene un mínimo de cuatro leucinas, cada una de ellas separadas por seis aminoácidos (es decir, Leu-X_6-Leu-X_6-Leu-X_6-Leu, donde X es cualquiera de los aminoácidos comunes). Dado que hay 3,6 aminoácidos por giro de hélice α, las leucinas se alinean en un borde de la hélice, con una leucina por cada dos giros de hélice (Figura 9.24). La hélice rica en leucina establece una interacción hidrofóbica con una segunda hélice de leucina de otra subunidad proteica, de modo que las dos subunidades "cierran la cremallera" formando un dímero (Figuras 9.24 y 9.25). El motivo cremallera de leucina no interacciona directamente con el DNA, como lo hacen los dedos de zinc o las hélice–giro–hélice. Sin embargo, si no se forman los dímeros, la proteína no se unirá fuertemente al DNA. La región de unión al DNA es adyacente al motivo de la cremallera hacia el extremo NH_2 en la estructura primaria. La región de unión al DNA contiene una concentración elevada de aminoácidos básicos, arginina y lisina. Esta región conservada evolutivamente interacciona directamente con el DNA cargado negativamente. Las cargas positivas de las cadenas laterales de la arginina y la lisina son atraídas por las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA. Debido a la región de unión al DNA formada por aminoácidos básicos precisamente en el NH_2 terminal de la región de la cremallera de leucina de cada una de las cadenas polipeptídicas, la estructura se designa estructura "bZIP", donde b representa la región aminoácida **b**ásica y ZIP proviene de motivo adyacente de cremallera (en inglés **zip**per) (véase p. 355).



(a)



(b)

FIGURA 9.24
Motivo de cremallera de leucina de las proteínas de unión al DNA.
(a) Análisis de la rueda helicoidal del motivo de cremallera de leucina en una proteína de unión a DNA. La secuencia de aminoácidos en el análisis de la rueda se muestra a lo largo del eje de una estructura α-helicoidal esquemática. Las leucinas (Leu) se observan alineadas a lo largo de un canto de la hélice (residuos 1, 8, 15 y 22 de la secuencia). *(b)* La estructura de rayos X, vista lateral, en la que las hélices se presentan en forma de cintas y las cadenas laterales en forma de varillas. Los residuos que contienen leucina aparecen en amarillo y verde.
Parte (a) adaptada de W. H. Landschulz, P. E. Johnson y S. L. McKnight Science *240:1759, 1988; parte (b) de D. Voet y J. Voet* Biochemistry, *2nd ed. New York: Wiley, 1995, basado en una estructura de Peter Kim, MIT y Tom Alber, University of Utah School of Medicine. reproducido con permiso de John Wiley & Sons, Inc.*

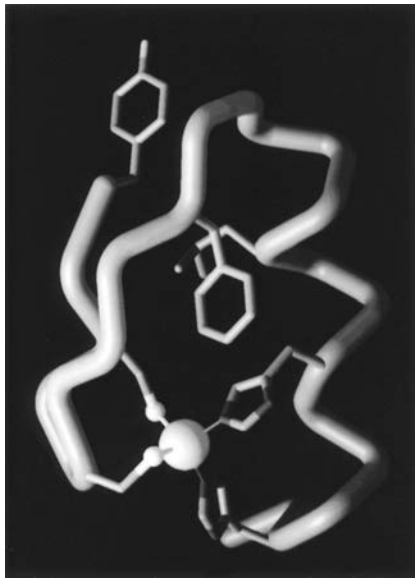


FIGURA 9.23
Estructura tridimensional obtenida por ^{1}H-RMN del motivo dedo de zinc de la proteína Xfin de *Xenopus* (secuencia mostrada en la Figura 9.22).
Superposición de 37 posibles estructuras derivadas de cálculos basados en ^{1}H-RMN. El extremo NH_2 se encuentra arriba a la izquierda y el extremo COOH abajo a la derecha. El zinc está representado por la esfera de la parte inferior de la figura, con residuos Cys a la izquierda y las histidinas a la derecha.
Fotografía proporcionada por Michael Pique y Peter W. Wright, Department of Molecular Biology, Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, California.

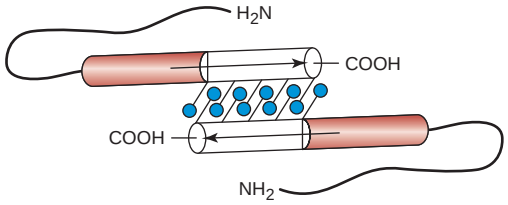


FIGURA 9.25
Esquema de dos proteínas con cremallera de leucina en asociación antiparalela.
En color rosa se muestran los dominios de unión a DNA que poseen un gran contenido en aminoácidos básicos (argininas y lisinas).
Adaptado de W. H. Landschulz, P. F. Johnson y S. L. McKnight, Science *240:1759, 1988*

El factor de transcripción GCN4 de levadura contiene el motivo de cremallera de leucina (bZIP). La Figura 9.26 muestra su asociación con su elemento de reconocimiento de DNA palindrómico. Este factor es un dímero compuesto por dos subunidades de hélices α continuas unidas por una interfase en cremallera de leucinas. Las hélices α se entrecruzan en la interfase para divergir a continuación con sus dos extremos N-terminales separados pasando directamente a través de diferentes sitios del mismo surco mayor en el DNA diana (Figura 9.26). Sorprendentemente, no se observan giros o pliegues en la estructura helicoidal lineal de las subunidades del dímero.

Muchas de las proteínas reguladoras que poseen el motivo cremallera de leucina han resultado ser productos de oncogenes (Myc, Jun y Fos). Fos forma un heterodímero con Jun a través de una interacción de tipo cremallera de leucina, y el dímero Fos/Jun se une a sitios reguladores de genes. Si las proteínas reguladoras mutan o son producidas de forma no regulada, la célula puede transformarse en una célula cancerosa.

Las proteínas de unión a DNA utilizan diversas estrategias para interaccionar con el DNA

El motivo hélice–giro–hélice fue el primer motivo de unión a DNA identificado. Estudios por rayos X de complejos proteína–DNA muestran que existe una gran variedad de otros mecanismos de asociación proteína–DNA. Las proteínas de unión a la secuencia TATA (TBP) se asocian a la secuencia TATA de los promotores génicos. La asociación de una TBP con la secuencia TATA constituye el fundamento para la

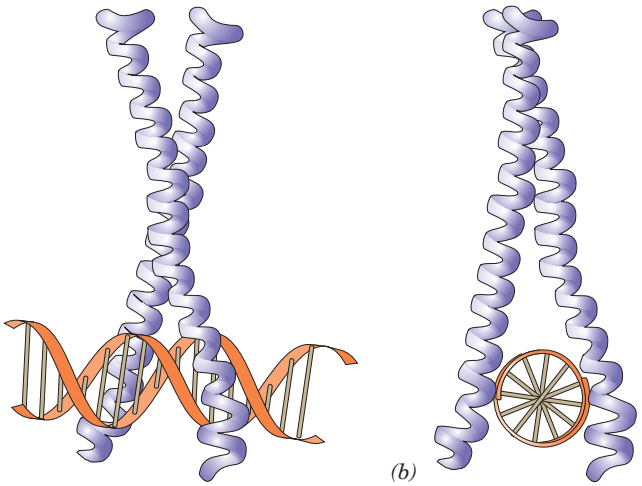
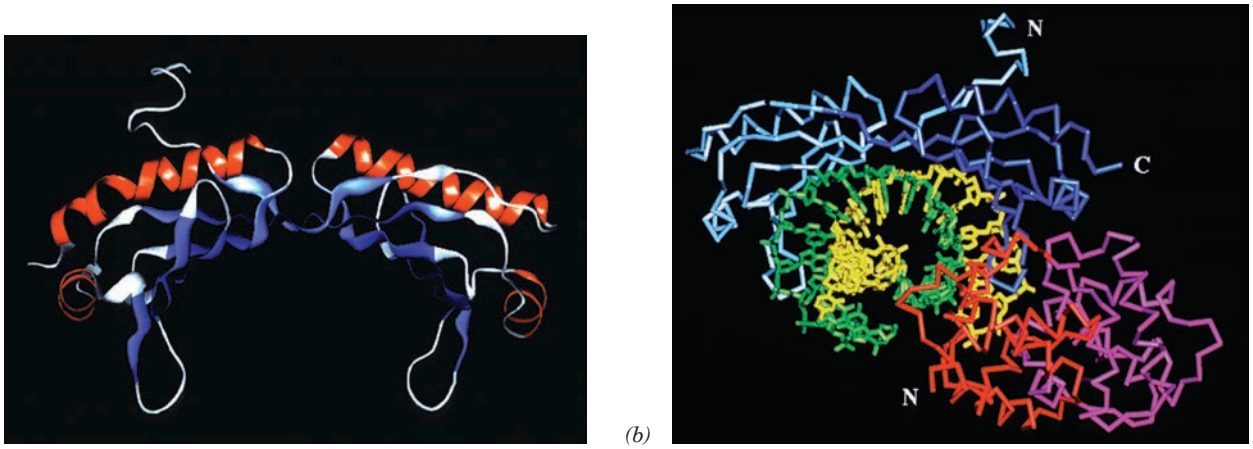


FIGURA 9.26
Estructura del complejo bZIP GCN4–DNA.
(*a*) La proteína bZIP es un dímero (cadenas polipeptídicas coloreadas en azul) en el que los monómeros están unidos por un motivo cremallera de leucina. Los extremos NH_2 se separan permitiendo que la región básica de la secuencia interaccione con el sitio diana en el surco mayor del DNA (el DNA está coloreado en naranja). (*b*) La misma interacción vista a lo largo del eje del DNA.
De Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K. y Harrison, S. C. Cell *71:1223, 1992.*



(*a*) (*b*)

FIGURA 9.27

Estructuras de los complejos binario TBP–DNA y ternario TBP–TFIIB–DNA de la proteína de unión a TATA.

(*a*) Modelo obtenido por ordenador a partir de la estructura de rayos X de la estructura tipo "silla de montar" de TBP; las hélices α y las cadenas β se muestran en rojo y azul, respectivamente; el resto de la estructura en blanco. (*b*) Complejo TBP–TFIIB–DNA. Las proteínas están representadas mediante un trazo que muestra el esqueleto de carbonos α, mientras que el DNA se muestra según el modelo de varillas. La primera secuencia repetida de TFIIB está coloreada en rojo y la segunda en magenta. Uno de los dominios de TBP está en azul claro, mientras que el segundo está en azul oscuro. La hebra de DNA codificadora se muestra en color verde y la no codificadora en amarillo. Los extremos N y C de TBP y TFIIB están indicados cuando son visibles. Véase la Figura 8.21, p. 351, para otra vista de la proteína de unión a TATA. *Cortesía de S. K. Burley. Reproducido con permiso de (a) Nikolov, D. B., Hu, S.-H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N.-H., Roeder, R. G. y Burley, S. K.* Nature *360:40, 1992; y (b) Nikolov, D. B., Chen, H., Halay, E. D., Usheva, A. A., Hisatake, K., Lee, D. K., Roeder, R. G. y Burley, S. K.* Nature *377:119, 1995. Copyright © 1992 y 1995 Macmillan Magazines Limited.*

formación de un gran complejo proteico que inicia la transcripción génica por parte de la RNA polimerasa. La estructura por rayos X del dominio C-terminal de la TBP unida a la secuencia TATA muestra que la TBP contiene dos dominios, cada uno de ellos compuesto por una hoja β antiparalela curvada que forma una superficie cóncava. La estructura de los dos dominios da lugar a una forma en "silla de montar" que se asienta sobre la doble hélice del DNA. La superficie cóncava de la "silla" distorsiona la estructura del B-DNA y desenrolla parcialmente la hélice del DNA. A su vez, esta distorsión da lugar a un surco menor muy abierto, pero poco profundo, que interacciona extensamente con la parte inferior de la silla de TBP (Figura 9.27*a*). Una proteína de importancia crítica, que forma parte del complejo de iniciación de la transcripción del RNA, es TFIIB. La estructura de rayos X muestra que, en el complejo con la secuencia TATA, TFIIB está asociado con uno de los "estribos" de la "silla" de TBP (Figura 9.27*b*).

La proteína p53 es un factor de transcripción que, cuando detecta DNA dañado, activa la expresión de los genes que inhiben la división celular, dándole tiempo a la célula para reparar el DNA dañado. Alternativamente, puede dar instrucciones a la célula para que experimente apoptosis (muerte celular programada) en el caso de que la lesión del DNA sea demasiado extensa para ser reparada. Este factor de transcripción es una proteína supresora de tumores clave ya que su ausencia permite que se acumule DNA mutado en una célula, lo que conduce a su transformación en célula cancerosa. En la mayoría de los cánceres humanos se encuentran formas de p53 mutantes o inactivas. El dominio de unión a DNA de p53 consta de dos hojas de cadenas β antiparalelas, similares al plegamiento de la inmunoglobulina. Este plegamiento central proporciona el andamiaje para el **motivo bucle–hoja–hélice** y para los dos grandes bucles (de 15 y 32 residuos) que interaccionan con el DNA. La hélice α (denominada H2) del motivo bucle–hoja–hélice encaja en un surco mayor con el bucle 1 (L1), mientras que el bucle 3 (L3) interacciona fuertemente con el surco menor adyacente (Figura 9.28*a*). La Figura 9.28*b* muestra los aminoácidos que comúnmente se encuentran mutados en cánceres humanos. Muchas de las mutaciones se localizan en los residuos que interaccionan directamente con el DNA, tal como la Arg 248, que forma parte del bucle 3. Otras mutaciones se hallan en residuos situados en el núcleo del dominio necesario para la estabilidad de la proteína. El factor p53 se une al DNA en forma de tetrámero (Figura 9.28*c*).

Los factores de transcripción NF-κB son miembros ubicuos de la familia Rel. Regulan diversos genes, especialmente los que juegan algún papel en la diferencia-

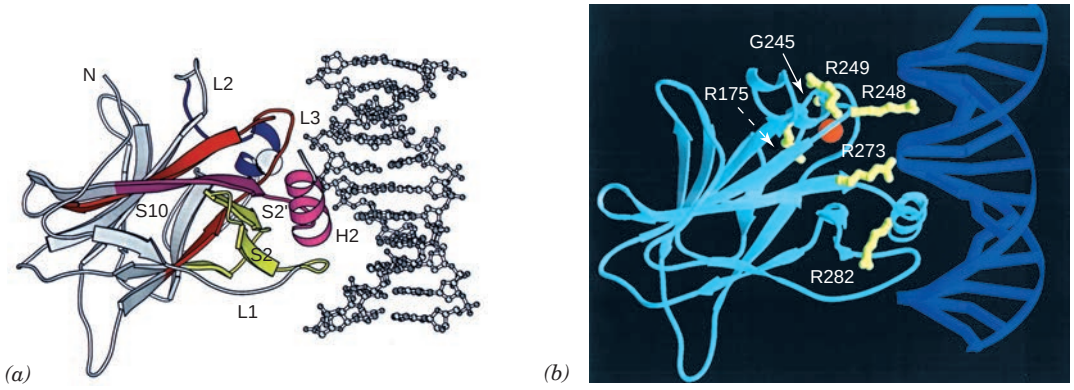


FIGURA 9.28
Estructura del complejo p53–DNA.
(*a*) Estructura del dominio central del monómero p53 acomplejado con el DNA. Las cadenas β (S), hélices α (H), bucles (L) y el átomo de zinc (esfera) están indicados con letras y números. La hélice (H2), el bucle 1 (L1) y el bucle 3 (L3) están asociados con los surcos mayor y menor del DNA diana. (*b*) Las cadenas laterales de los aminoácidos que se han encontrado mutados con mayor frecuencia en cánceres humanos están coloreados en amarillo, mientras que el átomo de zinc lo está en naranja. (*c*) Estructura del tetrámero de p53 asociado al DNA. Cada monómero del tetrámero se une a un sitio de fijación concreto y de secuencia consensuada situado en el DNA diana tal como se muestra en (a). Los cuatro dominios centrales del tetrámero se muestran en color verde, púrpura, amarillo y rojo, y el DNA en azul.
Reproducido con permiso de Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. y Pavletich, N. P. Science *265:346, 1994. Copyright 1994 American Association for the Advancement of Science. Figuras cortesía del Dr. N.P. Pavletich, Memorial Sloan-Kettering.*

ción y en los mecanismos celulares de defensa frente a infecciones. La proteína p50 NF-κB tiene dos dominios interconectados por una región de enlace de 10 aminoácidos (Figura 9.29*a*). Cada dominio contiene un núcleo de cadenas antiparalelas en barril β que presentan homología estructural con el motivo del plegamiento de la inmunoglobulina. El dominio C-terminal proporciona la interfase del dímero,

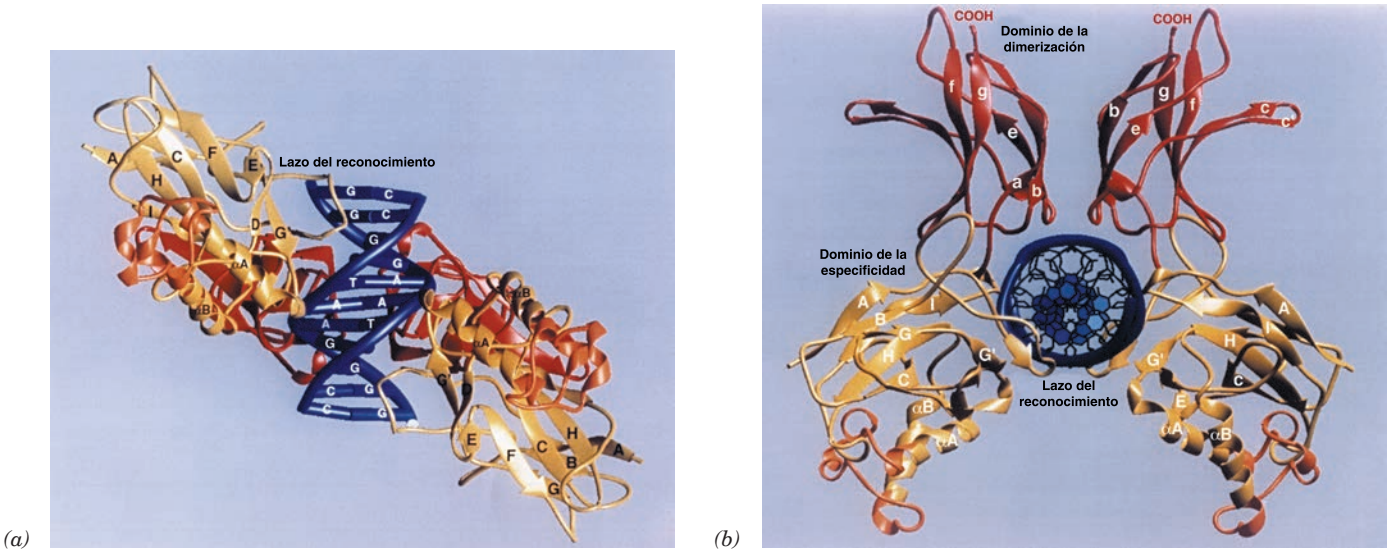


FIGURA 9.29
Estructura del homodímero de p50 NF-κB con el DNA.
En las estructuras sólo se muestran los residuos 43 a 352 de ambas subunidades. La proteína p50 NF-κB se une en forma de dímero. En cada monómero, el dominio N-terminal está coloreado en amarillo y el C-terminal en rojo. (*a*) Vista a lo largo del eje del DNA. (*b*) Vista alternativa del mismo complejo.

Reproducido con permiso de Müller, C. W., Rey, F. A., Sodeoka, M., Verdine, G. L. y Harrison, S. C. Nature *373:311, 1995. Copyright 1995 Macmillan Magazines Limited.*

en la que las superficies de los dominios con plegamiento similar al de la inmunoglobulina se empaquetan entre sí formando la interfase entre las subunidades. Los dominios N-terminal y C-terminal, así como el bucle que los conecta, se unen a la superficie del DNA, aportando 10 bucles (5 por cada subunidad del dímero) que rellenan la totalidad del surco mayor del DNA diana (Figura 9.29). Los dominios N-terminales tienen también un segmento α-helicoidal que establece una interacción fuerte en el surco menor cerca de la parte central del elemento diana. A diferencia de muchas otras proteínas de unión a DNA, el dímero p50 NF-κB no establece contactos con dos sitios separados en el DNA diana. Por el contrario, los contactos de uno de los monómeros se combinan con los del segundo monómero, estableciendo una interacción continua a través del único sitio de unión en el DNA.

En la Sección 8.8, el complejo de preiniciación en los eucariotas: factores de transcripción, RNA polimerasa II y DNA (p. 354) también se describen las estructuras hélice-giro-hélice, dedos de zinc y proteínas hélice-lazo-hélice.

9.5 HEMOGLOBINA Y MIOGLOBINA

Las hemoglobinas son proteínas globulares, presentes en altas concentraciones en los hematíes, que fijan oxígeno en los pulmones y lo transportan a las células. Las hemoglobinas también actúan como transportadores de CO_2 y de protones desde los tejidos a los pulmones, además, transportan y liberan óxido nítrico (NO) en los vasos sanguíneos de los tejidos. La estructura molecular y la química de las hemoglobinas realizan estas múltiples y complejas funciones fisiológicas de manera exquisita.

La hemoglobina humana se encuentra en varias formas

Una molécula de **hemoglobina** consta de cuatro cadenas polipeptídicas con dos secuencias de aminoácidos diferentes. La forma principal de hemoglobina humana adulta, **HbA_1**, consta de dos cadenas α y dos cadenas β ($\alpha_2\beta_2$). El polipéptido α contiene 141 aminoácidos, mientras que el β contiene 146 aminoácidos. En la sangre del feto humano y de embriones tempranos predominan otras formas de hemoglobina (Figura 9.30). La forma fetal (**HbF**) contiene dos cadenas α iguales a las presentes en HbA_1, pero la segunda clase de cadena (cadena γ) que se encuentra en la molécula tetramérica difiere de las cadenas β de la HbA_1 de adulto en la secuencia de aminoácidos (Tabla 9.8). En los primeros meses posteriores a la concepción aparecen dos formas adicionales (embrionarias), en las que las cadenas α son sustituidas por cadenas *zeta* (ζ) de secuencia de aminoácidos distinta, y las cadenas ϵ realizan la función de las cadenas β. Una forma minoritaria de hemoglobina adulta, la **HbA_2**, constituye alrededor del 2% de la hemoglobina adulta normal, y está compuesta por dos cadenas α y dos cadenas designadas *delta* (δ) (Tabla 9.8). En la Apli. Clín. 9.6 se presenta una discusión sobre las hemoglobinas anormales.

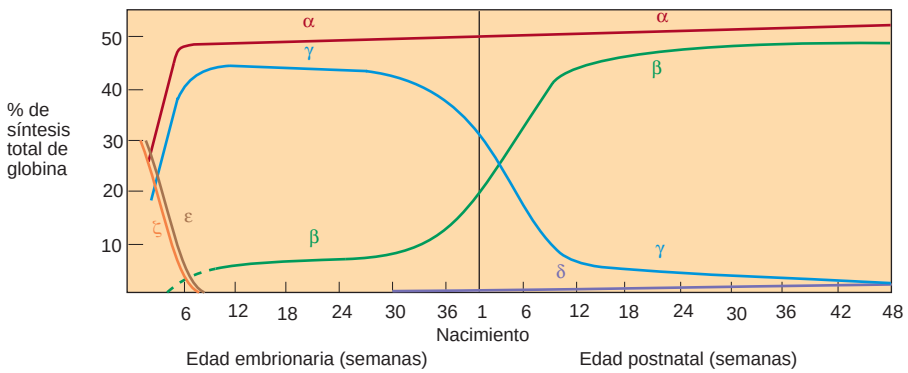


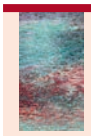
FIGURA 9.30
Cambios en la producción de las cadenas de globina durante el desarrollo.
Basado en una figura en A. W. Nienhuis y T. Maniatis, G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. Leder y P. W. Majerus (Eds.). En: The Molecular Basis of Blodd Diseases, *Philadelphia: W. B. Saunders, 1987, p. 68, en la que se agradece la referencia de Weatherall, D. J. y Clegg, J. B.,* The Thalassemia Syndromes, *3rd ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981.*

TABLA 9.8 Cadenas de la hemoglobina humana

Estado de desarrollo	*Símbolo*	*Cadenas*
Adulto	HbA_1	$\alpha_2\beta_2$
Adulto	HbA_2	$\alpha_2\delta_2$
Feto	HbF	$\alpha_2\gamma_2$
Embrión	Hb Gower-1	$\zeta_2\varepsilon_2$
Embrión	Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$

La mioglobina: una cadena polipeptídica única con un sitio de fijación de O_2

La **mioglobina** (Mb) es una proteína transportadora de O_2 que fija y libera O_2 en función de los cambios en la concentración de oxígeno del sarcoplasma de las células musculares esqueléticas. A diferencia de la hemoglobina, que tiene cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro centros de fijación de O_2, la mioglobina está compuesta por una sola cadena polipeptídica y un solo centro de fijación de O_2. La mioglobina constituye un modelo de lo que sucede cuando una molécula protomérica sencilla actúa en solitario sin las interacciones mostradas entre los cuatro centros de fijación de O_2 en la molécula tetramérica más compleja de la hemoglobina. La fijación de O_2 a la hemoglobina revela que los cuatro sitios fijadores de O_2 no actúan independientemente sino de forma cooperativa.



APLICACIÓN CLÍNICA 9.6
Hemoglobinopatías

Están documentados más de 400 mutantes diferentes de hemoglobinas humanas. Las mutaciones producen inestabilidad en la estructura de la hemoglobina, una afinidad por el oxígeno incrementada o disminuida, o un aumento en la velocidad de oxidación del ion ferroso del hemo (Fe^{2+}) al estado de oxidación férrico (Fe^{3+}). Una hemoglobina férrica no funcional se denomina methemoglobina y se simboliza mediante HbM. Las hemoglobinas inestables aparecen como consecuencia de la sustitución de un aminoácido por prolina dentro de una región α-helicoidal del pliegue de globina. Las prolinas no participan en la estructura α-helicoidal, con lo que la rotura de un segmento de hélice α puede producir una hemoglobina inestable (ejemplos de ello son $Hb^{\beta Leu14\rightarrow Pro}_{Saki}$ y $Hb^{\beta 28Leu\rightarrow Pro}_{Genova}$). Se generan otras hemoglobinas inestables por sustitución de la cadena lateral de un aminoácido por otra que es demasiado grande o demasiado pequeña para establecer los contactos adecuados, o por colocación de un grupo cargado o polar en el interior de un dominio. Las hemoglobinas inestables se desnaturalizan fácilmente y precipitan dentro del eritrocito, formando cuerpos de Heinz, que dañan la membrana del eritrocito. Los pacientes con hemoglobinas inestables pueden sufrir anemia, reticulocitosis, esplenomegalia y urobilinuria. Diversas hemoglobinas mutantes tiene una afinidad por el oxígeno incrementada (menor P_{50}). Un ejemplo interesante es la $Hb^{\beta His146\rightarrow Leu}_{Cowtown}$, en la que desaparece la histidina que disocia el 50% de los protones del efecto Bohr. Esta mutación impide la regulación de la disociación del oxígeno por la concentración de ion hidrógeno y desestabiliza la conformación T en relación con la conformación R, produciendo un incremento en la afinidad por el oxígeno. Las mutaciones de la hemoglobina que impiden la fijación del BPG también aumentan la afinidad por el oxígeno. Las hemoglobinopatías en las que aumenta la afinidad por el oxígeno también se caracterizan a menudo por anemia hemolítica y formación de cuerpos de Heinz. Estas hemoglobinas no pueden ceder su oxígeno a los tejidos de acuerdo con sus necesidades.

Entre las hemoglobinas mutantes que forman methemoglobina se cuentan $HbM^{\alpha 87His\rightarrow Tyr}_{Iwate}$ y $HbM^{\beta 92His\rightarrow Tyr}_{Hyde\ Park}$, en la que están mutadas las histidinas proximales F8 en las cadenas α y β, respectivamente. En la $HbM^{\alpha 58His\rightarrow Tyr}_{Boston}$ y $HbM^{\beta 63His\rightarrow Tyr}_{Saskatoon}$ están mutadas las histidinas distales E7. Las mutaciones de aminoácidos que se empaquetan contra el hemo o forman el sitio de fijación del oxígeno conducen frecuentemente a una methemoglobinemia. Los pacientes que contiene altas concentraciones de methemoglobina presentan cianosis (color azulado de la piel).

Dos de las mutaciones más prevalentes encontradas en la hemoglobina tienen lugar en la misma posición de aminoácido, la β6Glu. Cuando este glutamato es reemplazado por valina, el resultado es $HbS^{\beta 6Glu\rightarrow Val}$, mientras que la sustitución del glutamato por lisina da $HbC^{\beta 6Glu\rightarrow Lys}$. Los homocigotos con HbS expresan la anemia falciforme en la que las moléculas de hemoglobina precipitan en forma de tactoides o largos ordenamientos. Esta formación produce la forma de hoz de los eritrocitos característica de la enfermedad (véase Apli. Clín. 3.3). La HbC difiere de la HbS en que forma una estructura de agregados diferente, cristaloides con los extremos romos. Esto reduce el tiempo de supervivencia de los eritrocitos pero presenta menos hemólisis que la HbS; esta forma de hemoglobinopatía presenta efectos patológicos más limitados. Dado que tanto la HbS como la HbC se encuentran frecuentemente entre ciertas poblaciones negras de Africa, no es raro encontrar individuos heterocigotos para ambos genes mutantes entre esta población. Los individuos con HbSC tienen una anemis intermedia entre la observada para los homocigotos de HbS y de HbC.

Dickerson, R. E. y Geis, I. *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology*. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1983; y Arcasoy, M. O. y Gallagher, P. G. Molecular diagnosis of hemoglobinopathies and other red blood cell disorders. *Semin. Hematol.* 36:328, 1999.

En el sitio de fijación de O_2 se encuentra un grupo prostético hemo

Las cuatro subunidades polipeptídicas de globina en la hemoglobina y la de la mioglobina contienen cada una un grupo prostético hemo. Un **grupo prostético** es una porción no polipeptídica que constituye una parte funcional de una proteína. Una proteína sin su grupo prostético se denomina **apoproteína**. Una proteína con su grupo prostético se denomina **holoproteína**.

El **hemo** es la **protoporfirina IX** (véase p. 1063) con un átomo de hierro en su centro (Figura 9.31). El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (carga +2) en la hemoglobina y mioglobina funcionales. El átomo ferroso del hemo puede formar cinco o seis enlaces de coordinación en función de si el O_2 está o no unido a la proteína. Cuatro enlaces son con los átomos de nitrógeno pirrólicos de la porfirina. Dado que todos los anillos pirrólicos de la porfirina se encuentran en un mismo plano, los cuatro enlaces que van desde la porfirina al átomo de hierro situado en su centro tendrán una tendencia a coincidir con el plano del anillo porfirínico. El quinto y el potencialmente sexto enlaces de fijación del átomo ferroso del hemo se encuentran situados a lo largo de un eje perpendicular al plano del anillo de la porfirina (Figura 9.32). El quinto enlace de coordinación del átomo ferroso de los hemos se hace con un nitrógeno del imidazol de una histidina. Esta histidina se designa como **histidina próxima** en las estructuras de la hemoglobina y de la mioglobina (Figuras 9.32 y 9.33). Cuando está unido a la hemoglobina y a la mioglobina, el O_2 forma un sexto enlace de coordinación con el átomo ferroso. En esta posición ligada, el oxígeno está colocado entre el átomo ferroso al cual está unido y un segundo imidazol de una histidina, designada como **histidina distal**. En la desoxihemoglobina, la sexta posición de coordinación del átomo ferroso se halla desocupada. El hemo se sitúa dentro de una bolsa hidrofóbica que se forma en cada una de las subunidades de globina en donde se establecen unas 80 interacciones entre 18 residuos y el hemo. La mayoría de estas interacciones no covalentes son entre cadenas laterales apolares de aminoácidos y las regiones no polares de la porfirina. Tal como se ha descrito en el Capítulo 3, la fuerza motriz de estas interacciones es la liberación de agua de solvatación que se produce al asociarse el hemo hidrofóbico con las cadenas laterales

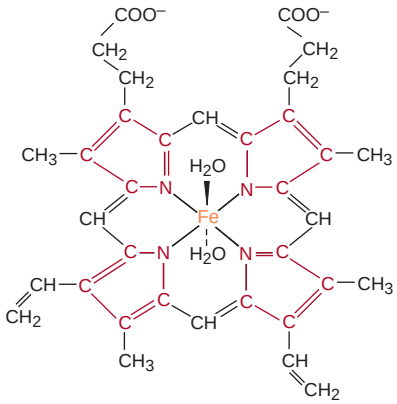


FIGURA 9.31
Estructura del hemo.

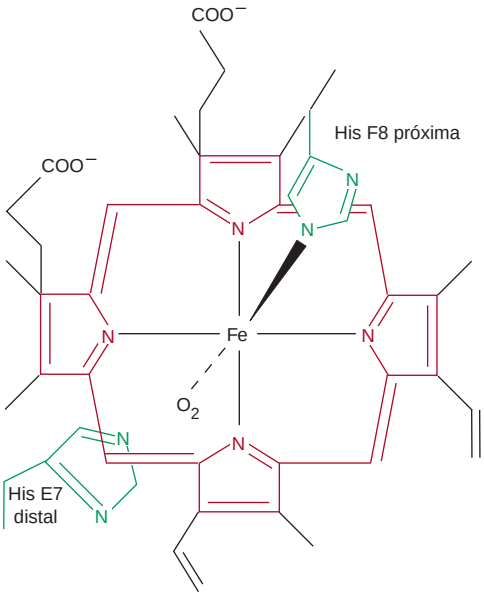


FIGURA 9.32
Enlaces de coordinación del átomo ferroso en la oxihemoglobina.

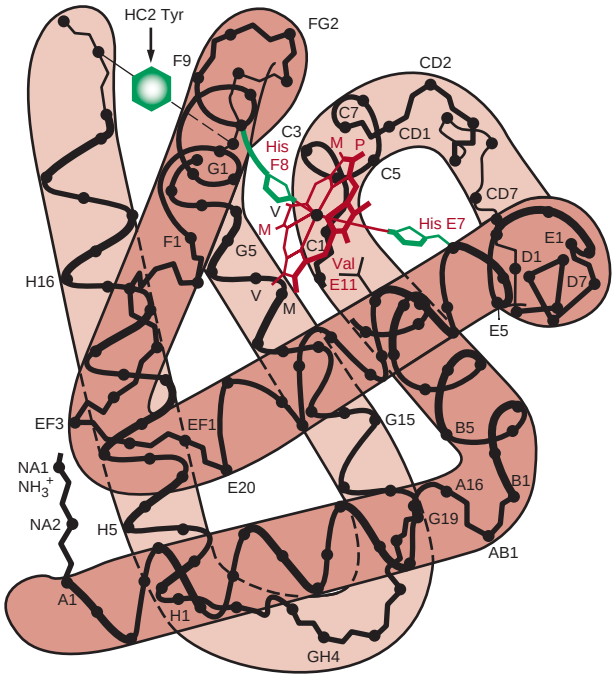


FIGURA 9.33
Características de las estructuras secundaria y terciaria de las cadenas de globina de la hemoglobina.
Se muestran las cadenas laterales de la His F8 próxima, His-E7 distal y de la Val-E11. Los otros aminoácidos de la cadena polipeptídica se representan solamente por la posición de sus carbonos α; las letras M, V y P se refieren a las cadenas laterales metilo, vinilo y propionato del hemo.
Reproducido con permiso de M. Perutz, Brit, Med. Bull., *32:195, 1976.*

apolares de los aminoácidos de la bolsa del hemo. En la mioglobina se establecen interacciones no covalentes adicionales entre los grupos propionato del hemo cargados negativamente y las cadenas laterales cargadas positivamente de arginina e histidina de la proteína. En las cadenas de la hemoglobina, sin embargo, una diferencia en la secuencia de aminoácidos en esta región del centro de fijación del hemo conduce a la estabilización de los propionatos de la porfirina mediante la interacción con el imidazol no cargado de una histidina y con moléculas de agua del disolvente hacia la superficie exterior de la molécula.

La cristalografía de rayos X ha contribuido a la definición de la estructura de la hemoglobina y de la mioglobina

La estructura de las formas oxi y desoxi de la hemoglobina y de la mioglobina se ha resuelto por cristalografía de rayos X. De hecho, la mioglobina de cachalote fue la primera proteína globular cuya estructura tridimensional completa se determinó mediante esta técnica. A continuación se determinó por rayos X la estructura de una molécula más compleja, la hemoglobina de caballo. Estas estructuras ponen de manifiesto que cada globina en las hemoglobinas y la subunidad sencilla de la mioglobina se componen de múltiples regiones α-helicoidales conectadas por giros de la cadena polipeptídica que permiten a la proteína plegarse en una forma esférica característica del plegamiento de globina (Figura 9.33; véase también la Figura 3.33). El mecanismo de las asociaciones cooperativas del O_2, que se trata más adelante, está basado en las estructuras obtenidas por rayos X de la oxihemoglobina, la desoxihemoglobina y de diversos derivados de hemoglobina.

Estructuras primaria, secundaria y terciaria de la mioglobina y de las cadenas individuales de la hemoglobina

Se han determinado las secuencias de aminoácidos de la cadena polipeptídica de la mioglobina de 23 especies animales diferentes. Todas las mioglobinas contienen 153 aminoácidos en sus cadenas polipeptídicas, de los que 83 son invariables. Sólo 15 de estos residuos invariables de la secuencia de la mioglobina son idénticos a los residuos invariables de las cadenas de globina de las hemoglobinas de mamíferos secuenciadas. Sin embargo, los cambios son, en la mayor parte de los casos, de naturaleza conservadora y mantienen las propiedades físicas generales del residuo (Tabla 9.9). Dado que la mioglobina es activa en forma de monómero, gran parte de las posiciones superficiales interaccionan con el agua impidiendo la asociación con otra molécula de mioglobina. Por el contrario, los residuos de la superficie de las subunidades individuales de la hemoglobina están diseñados para proporcionar puentes de hidrógeno y contactos no polares con otras subunidades en la estructura cuaternaria de la hemoglobina. Las histidinas próxima y distal se conservan en la secuencia de todas las cadenas polipeptídicas. Otros residuos invariables se encuentran en la bolsa hidrofóbica del hemo formando contactos no polares esenciales con el hemo que estabilizan el complejo hemo-proteína.

Al tiempo que existe una sorprendente variabilidad en la secuencia de aminoácidos entre las diferentes cadenas polipeptídicas, las estructuras secundaria y terciaria aparecen, en una primera aproximación, casi idénticas (Figura 9.34). Las diferencias significativas en las propiedades fisiológicas entre las cadenas α, β, γ y δ de las hemoglobinas y la cadena polipeptídica sencilla de la mioglobina se deben a cambios específicos más bien pequeños en sus estructuras. La semejanza en la estructura terciaria, resultante de secuencias de aminoácidos muy diversas, muestra que se puede llegar a la misma estructura plegada de una cadena polipeptídica a través de muchas secuencias diferentes.

Aproximadamente el 70% de los residuos participan en la estructura secundaria α-helicoidal que genera siete segmentos helicoidales en la cadena α y ocho en la cadena β. Estas ocho regiones helicoidales se designan comúnmente con las letras de la A a la H, empezando con la hélice A en el extremo NH_2-terminal. Las regiones interhelicoidales se designan AB, BC, CD, …, GH, respectivamente. La región no helicoidal que se encuentra entre el extremo HN_2-terminal y la hélice A se designa como región NA, y la región situada entre el extremo COOH-terminal y la hélice H se designa región HC (Figura 9.33 y Tabla 9.9). Este sistema de nomenclatura permite discutir acerca de determinados residuos que tienen papeles funcionales y estructurales similares en la hemoglobina y en la mioglobina.

TABLA 9.9 Secuencias de aminoácidos de las cadenas de hemoglobina humanas y de la mioglobina de cachalote[a]

		NA 1	2	3	A 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	A 16	AB 1	B 1	2	3	4	5	6
MIOGLOBINA		Val	…	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Trp	Gln	Leu	Val	Leu	His	Val	Trp	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Asp	Val	Ala	Gly	His	Gly
HEMOGLOBINA	Caballo α	Val	…	Leu	Ser	Ala	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Ser	Lys	Val	Gly	Gly	His	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly
	β	Val	Gln	Leu	Ser	Gly	Glu	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Trp	Asp	Lys	Val	Asn	…	…	Glu	Glu	Glu	Val	Gly
	Humana α	Val	…	Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Gly	Lys	Val	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly
	β	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	…	…	Val	Asp	Glu	Val	Gly
	γ	Gly	His	Phe	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ilu	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	…	…	Val	Glu	Asp	Ala	Gly
	δ	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	…	…	Val	Asp	Ala	Val	Gly
		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	C 1	2	3	4	5	6	7	CD 1	2	3	4	5	6	7	8	D 1
MIOGLOBINA		Gln	Asp	Ilu	Leu	Ilu	Arg	Leu	Phe	Lys	Ser	His	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Arg	Phe	Lys	His	Leu	Lys	Thr
HEMOGLOBINA	Caballo α	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Gly	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	…	Asp	Leu	Ser	His
	β	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Gly
	Humana α	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	…	Asp	Leu	Ser	His
	β	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Thr
	γ	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asn	Leu	Ser	Ser
	δ	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Ser
		2	3	4	5	6	7	E 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	E 15	16	17	18	19	20
MIOGLOBINA		Glu	Ala	Glu	Met	Lys	Ala	Ser	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	His	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Ilu	Leu	Lys
HEMOGLOBINA	Caballo α	…	…	…	…	…	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Gly
	β	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	His	Ser	Phe	Gly	Glu	Gly	Val	His
	Humana α	…	…	…	…	…	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Val	Ala
	β	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala
	γ	Ala	Der	Ala	Ilu	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Asp	Ala	Ilu	Lys
	δ	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala
		EF 1	2	3	4	5	6	7	8	F 1	2	3	4	F 5	6	7	8	9	FG 1	2	3	4	5	G 1	2	3	4
MIOGLOBINA		Lys	Lys	Gly	His	His	Glu	Ala	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Ala	Gln	Ser	His	Ala	Thr	Lys	His	Lys	Ilu	Pro	Ilu	Lys	Tyr
HEMOGLOBINA	Caballo α	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Asn
	β	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn
	Humana α	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Asn
	β	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn
	γ	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Gln	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn
	δ	His	Leu	Asn	Asp	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ser	Gln	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn
		5	6	7	8	G 9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	GH 1	2	3	4	5	6	H 1	2	H 3	4	5
MIOGLOBINA		Leu	Glu	Phe	Ilu	Ser	Glu	Ala	Ilu	Ilu	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	His	Pro	Gly	Asn	Phe	Gly	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly
HEMOGLOBINA	Caballo α	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala	Val	His	Leu	Pro	Asn	Asp	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	His	Ala
	β	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Ala	Leu	Val	Val	Ala	Arg	His	Phe	Gly	Lys	Asp	Phe	Thr	Pro	Glu	Leu	Gln	Ala
	Humana α	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	His	Ala
	β	Phe	Srg	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Cys	Val	Leu	Ala	His	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Pro	Val	Gln	Ala
	γ	Phe	Lys	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Val	Leu	Ala	Ilu	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Glu	Val	Gln	Ala
	δ	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Cys	Val	Leu	Ala	Arg	Asn	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Gln	Met	Gln	Ala
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	H 21	22	23	2	HC 1	2	3	4	5		
MIOGLOBINA		Ala	Met	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Leu	Phe	Arg	Lys	Asp	Ilu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Lys	Glu	Leu	Gly	Tyr	Gln	Gly		
HEMOGLOBINA	Caballo α	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg								
	β	Ser	Tyr	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His								
	Humana α	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg								
	β	Ala	Tyr	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His								
	γ	Ser	Trp	Gln	Lys	Met	Val	Thr	Gly	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg	Tyr	His								
	δ	Ala	Tyr	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His								

Fuente: Basada en un diagrama de Dickerson, R. E. y Geis, I. *The Structure and Function of Proteins.* New York: Harper & Row, 1969, p. 52.

[a] Los residuos que son idénticos se incluyen en cuadros. A, B, C … designan diferentes hélices de la estructura terciaria (véase texto).

Un equilibrio sencillo describe la unión de O_2 a la mioglobina

La asociación del oxígeno a la mioglobina se caracteriza por una constante de equilibrio sencilla [Ecs. (9.1) y (9.2)]. En la Ec. (9.2), $[MbO_2]$ es la concentración de oximioglobina en la solución, [Mb] la concentración de desoximioglobina y $[O_2]$ la concentración de oxígeno expresadas en moles por litro de solución. La constante de equilibrio, K_{eq}, tiene también las unidades de moles por litro. Al igual que para cualquier constante de equilibrio verdadera, el valor de K_{eq} depende de las condiciones de pH, la fuerza iónica y la temperatura.

$$Mb + O_2 \overset{K_{eq}}{\rightleftharpoons} MbO_2 \qquad \textbf{(9.1)}$$

$$K_{eq} = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]} \qquad \textbf{(9.2)}$$

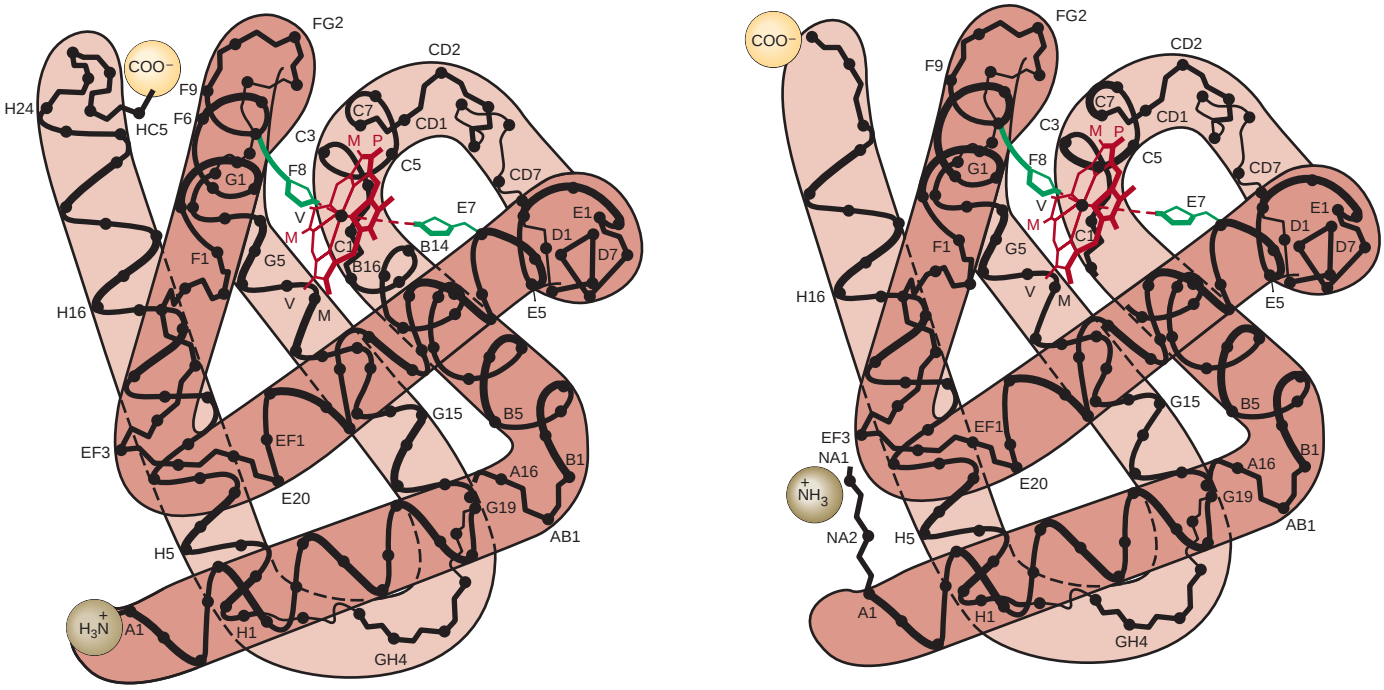


FIGURA 9.34
Comparación de la conformación de la cadena de la mioglobina (*a*) y de la cadena β de la HbA_1 (*b*).
Las estructuras globales son muy parecidas, excepto en los extremos NH_2- y COOH-terminales.

Reproducido con permiso de A. Fersht, Estructura y mecanismo de los enzimas. *Editorial Reverté, S. A. Barcelona.*

Debido a que el oxígeno es un gas, resulta más conveniente expresar la concentración de O_2 en función de la presión de oxígeno en unidades torr (1 torr es igual a la presión de 1 mm Hg a 0°C y gravedad patrón). En la Ec. (9.3) se ha llevado a cabo esta conversión, siendo P_{50} la constante de equilibrio y pO_2 la concentración de oxígeno expresadas ahora en unidades torr.

$$P_{50} = \frac{[\text{Mb}] \cdot pO_2}{[\text{MbO}_2]} \qquad \textbf{(9.3)}$$

La propiedades de una proteína fijadora de oxígeno se caracterizan utilizando una curva de saturación de oxígeno. En este tipo de gráfica se representa la fracción de los centros de fijación de oxígeno en la solución que contienen oxígeno [*Y*, Ec. (9.4)] en la ordenada frente a pO_2 (concentración de oxígeno) en la abscisa. El valor de *Y* en el caso de la mioglobina se describe sencillamente con la Ec. (9.5). Sustituyendo en la Ec. (9.5) el valor de $[\text{MbO}_2]$ obtenido de la Ec. (9.3) y dividiendo por [Mb], se obtiene la Ec. (9.6), que muestra la dependencia de *Y* del valor de la constante de equilibrio P_{50}, y de la concentración de oxígeno. A partir de las Ecs. (9.3) y (9.6) puede verse que el valor de P_{50} es igual a la concentración de oxígeno, pO_2, cuando $Y = 0{,}5$ (50% de los sitios asequibles ocupados). De aquí que la constante de equilibrio se designe con el subíndice 50.

$$Y = \frac{\text{número de centros de fijación ocupados}}{\text{número total de centros de fijación en solución}} \qquad \textbf{(9.4)}$$

$$Y = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]} \qquad \textbf{(9.5)}$$

$$Y = \frac{pO_2}{P_{50} + pO_2} \qquad \textbf{(9.6)}$$

La representación de la Ec. (9.6) de *Y* frente a pO_2 genera una curva de saturación de oxígeno para la mioglobina con la forma de una hipérbola rectangular (Figura 9.35).

Un sencillo reordenamiento algebraico de la Ec. (9.6) lleva a la Ec. (9.7). Tomando logaritmos en ambos miembros de la Ec. (9.7), resulta la Ec. (9.8) conocida como **ecuación de Hill**. La representación de log $[Y/(1 - Y)]$ frente a log pO_2 según la Ec. (9.8) da una línea recta con pendiente igual a 1 para la mioglobina (Figura 9.36). Esta gráfica se denomina gráfica de Hill y la pendiente (n_H) se conoce como **coeficiente de Hill** [véase Ec. (9.9)].

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{pO_2}{P_{50}} \tag{9.7}$$

$$\log\frac{Y}{1 - Y} = \log pO_2 - \log P_{50} \tag{9.8}$$

La unión de O_2 a la hemoglobina requiere la cooperatividad entre las subunidades de la hemoglobina

Mientras que la mioglobina tiene un solo centro de fijación de O_2 por molécula, las hemoglobinas, con cuatro subunidades monoméricas, tienen cuatro centros hemo fijadores de O_2. La fijación de las cuatro moléculas de O_2 a la hemoglobina presenta **cooperatividad positiva**, ya que la fijación del primer O_2 a la desoxihemoglobina facilita la fijación de O_2 a las otras subunidades de la molécula. Por el contrario, la disociación del primer oxígeno de la hemoglobina completamente oxigenada $[Hb(O_2)_4]$ facilitará la disociación del O_2 de las otras subunidades de la molécula tetramérica.

Debido a la cooperatividad en la asociación y disociación del oxígeno, la curva de saturación de oxígeno para la hemoglobina difiere de la obtenida con la mioglobina. La gráfica de Y en función de pO_2 en la hemoglobina tiene forma sigmoidea lo que indica cooperatividad en la asociación del oxígeno (Figura 9.35). La representación de la ecuación de Hill [Ec. (9.9)] da un valor de la pendiente (n_H) de 2,8 (Figura 9.36).

$$\log\frac{Y}{1 - Y} = n_H \log pO_2 - \text{constante} \tag{9.9}$$

El significado del coeficiente de Hill respecto a la asociación cooperativa del O_2 se puede evaluar cuantitativamente tal como se presenta en la Tabla 9.10. Se calcula un parámetro conocido como **índice de cooperatividad**, R_x, que muestra el incremento de pO_2 necesario para cambiar Y desde un valor de 0,1 (10% de los centros ocupados) a 0,9 (90% de los centros ocupados) para valores de los coeficientes de Hill obtenidos experimentalmente. En el caso de la mioglobina en que $n_H = 1$, se requiere un cambio de 81 veces en la concentración de oxígeno para pasar de $Y = 0,1$ a $Y = 0,9$. En la hemoglobina, en la que se observa cooperatividad positiva con $n_H = 2,8$, sólo se requiere un cambio de 4,8 veces en la concentración de oxígeno para cambiar la saturación fraccional de 0,1 a 0,9.

Mecanismo molecular de la cooperatividad en la fijación de O_2

Los datos de difracción de rayos X de la desoxihemoglobina muestran que los átomos ferrosos se sitúan a unos 0,4–0,6 Å fuera del plano de sus porfirinas. Esto es debido a dos factores. En la desoxihemoglobina, la configuración electrónica del átomo ferroso pentacoordinado tiene un radio ligeramente superior a la distancia desde el centro de la porfirina a cada uno de los nitrógenos pirrólicos. De este modo, el hierro sólo se puede colocar en el centro de la porfirina con cierta distorsión de la conformación de la misma. Una consideración probablemente más importante es que si el átomo de hierro se encuentra en el plano de la porfirina, el imidazol de la His-F8 próxima interacciona de forma desfavorable con átomos de la porfirina. La fuerza de esta interacción estérica desfavorable se debe, en parte, a las restricciones conformacionales sobre la His-F8 y la porfirina en la conformación de la desoxihemoglobina que fuerza el acercamiento de la His-F8 sobre la porfirina de una forma determinada (Figura 9.37). Estas restricciones son menos significativas en la oxihemoglobina.

La conformación con el átomo de hierro fuera del plano de la porfirina no presenta tensiones y está favorecida energéticamente para el átomo ferroso pentacoordinado. Sin embargo, cuando el O_2 se fija en la sexta posición de coordinación del

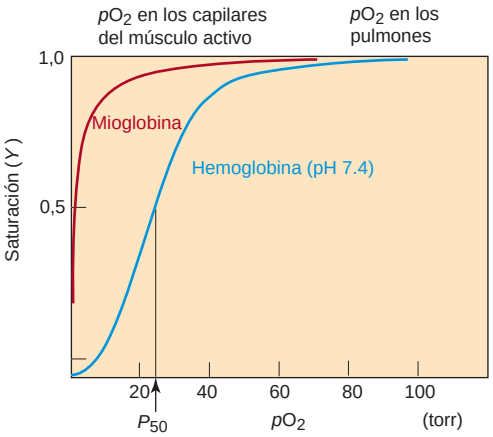


FIGURA 9.35
Curvas de fijación de oxígeno por la mioglobina y la hemoglobina.

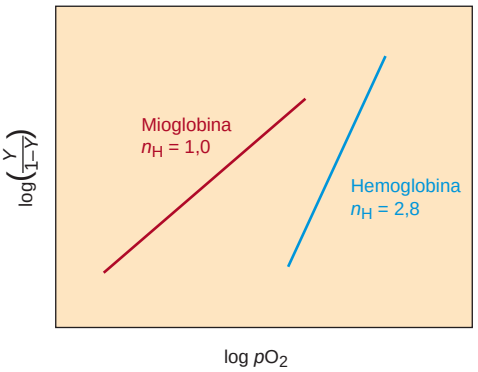


FIGURA 9.36
Gráficas de Hill para la mioglobina y la hemoglobina A_1.

TABLA 9.10 Relación entre el coeficiente de Hill (n_H) y el índice de cooperatividad (R_x)

n_H	R_x	*Observación*
0,5	6560	Cooperatividad de sustrato negativa
0,6	1520	
0,7	533	
0,8	243	
0,9	132	
1,0	81,0	Sin cooperatividad
1,5	18,7	
2,0	9,0	
2,8	4,8	Cooperatividad de sustrato positiva
3,5	3,5	
6,0	2,1	
10,0	1,6	
20,0	1,3	

Basado en la Tabla 7.1 de Cornish-Bowden, A. *Principles of Enzyme Kinetics.* London: Butterworths Scientific Publishers, 1976.

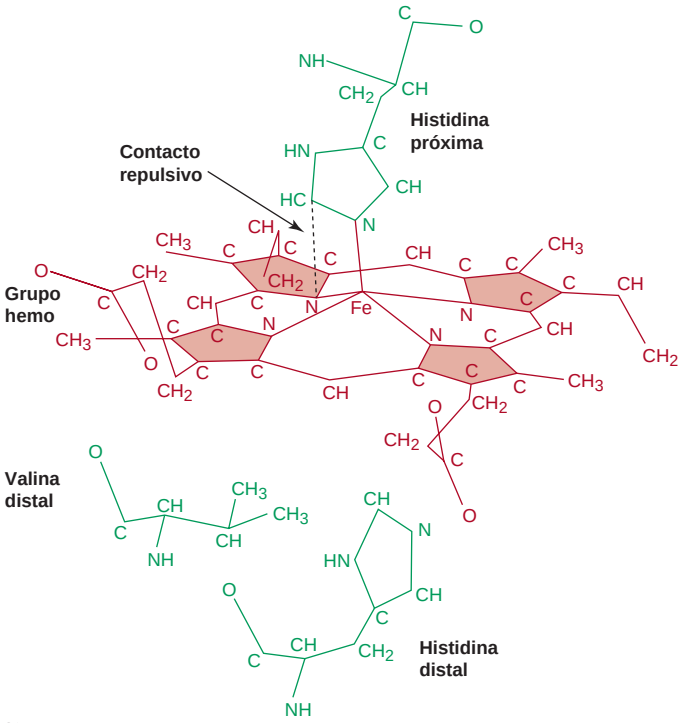


FIGURA 9.37
Impedimento estérico entre la histidina próxima y la porfirina en la desoxihemoglobina.
Adaptado de M. Perutz, Sci. Am., *239, 92, 1978 Copyright © 1978 by Scientific American, Inc. All Rights reserved.*

hierro, aparecen tensiones en esta conformación. Una conformación energéticamente más favorable para el átomo de hierro con oxígeno ligado es aquella en la que el átomo de hierro se encuentra en el plano de la estructura porfirínica.

Al fijarse el O_2 al átomo ferroso, la energía libre de formación del enlace supera las interacciones repulsivas entre la His-F8 y la porfirina, y el átomo ferroso se desplaza hacia el plano del anillo porfirínico. Esta es la posición más estable termodinámicamente para el átomo de hierro con seis enlaces de coordinación; un ligando axial se encuentra a cada lado del plano del anillo de porfirina, y la repulsión estérica de uno de los ligandos axiales con la porfirina está compensada con la repulsión del segundo ligando axial en el lado opuesto cuando el átomo ferroso se encuentra en el centro. Si el átomo de hierro se desplaza del centro, las interacciones estéricas de los dos ligandos axiales con la porfirina en la conformación desoxi están descompensadas, por lo que la estabilidad de esta estructura será menor que la de la configuración equidistante. Además, el radio del átomo de hierro con seis ligandos se reduce, lo que le permite situarse justamente en el centro de la porfirina, sin que haya distorsión de la conformación de esta última.

Dado que en la conformación desoxi debe vencerse la repulsión estérica entre la porfirina y la His-F8 cuando se produce la asociación del O_2, la fijación del primer O_2 a la hemoglobina se caracteriza por una afinidad relativamente baja. Sin embargo, cuando se produce la asociación de un O_2 al primer hemo de una molécula de desoxihemoglobina, el cambio en la posición del átomo de hierro, que pasa de estar por encima del plano de la porfirina a estarlo en el centro de la misma, desencadena un cambio conformacional de toda la molécula. El cambio de conformación da lugar a una mayor afinidad del O_2 con respecto a los otros centros hemo después de que se haya fijado el primer O_2.

La unión del O_2 tira del átomo de Fe^{2+} hacia el plano de la porfirina, mueve la His-F8 próxima hacia la porfirina, y también a la hélice F, a la que pertenece esta His-F8. El movimiento de esta hélice F provoca a su vez el movimiento del extremo FG de su subunidad, desestabilizando la interacción no covalente entre la región FG y la hélice C de la subunidad adyacente en la interfase de las subunidades α_1–β_2 o α_2–β_1 (Figuras 9.38 a 9.40).

Los contactos entre FG y C entre subunidades actúan como "conmutador", ya que existen en dos ordenamientos diferentes con formas diferentes de contacto entre

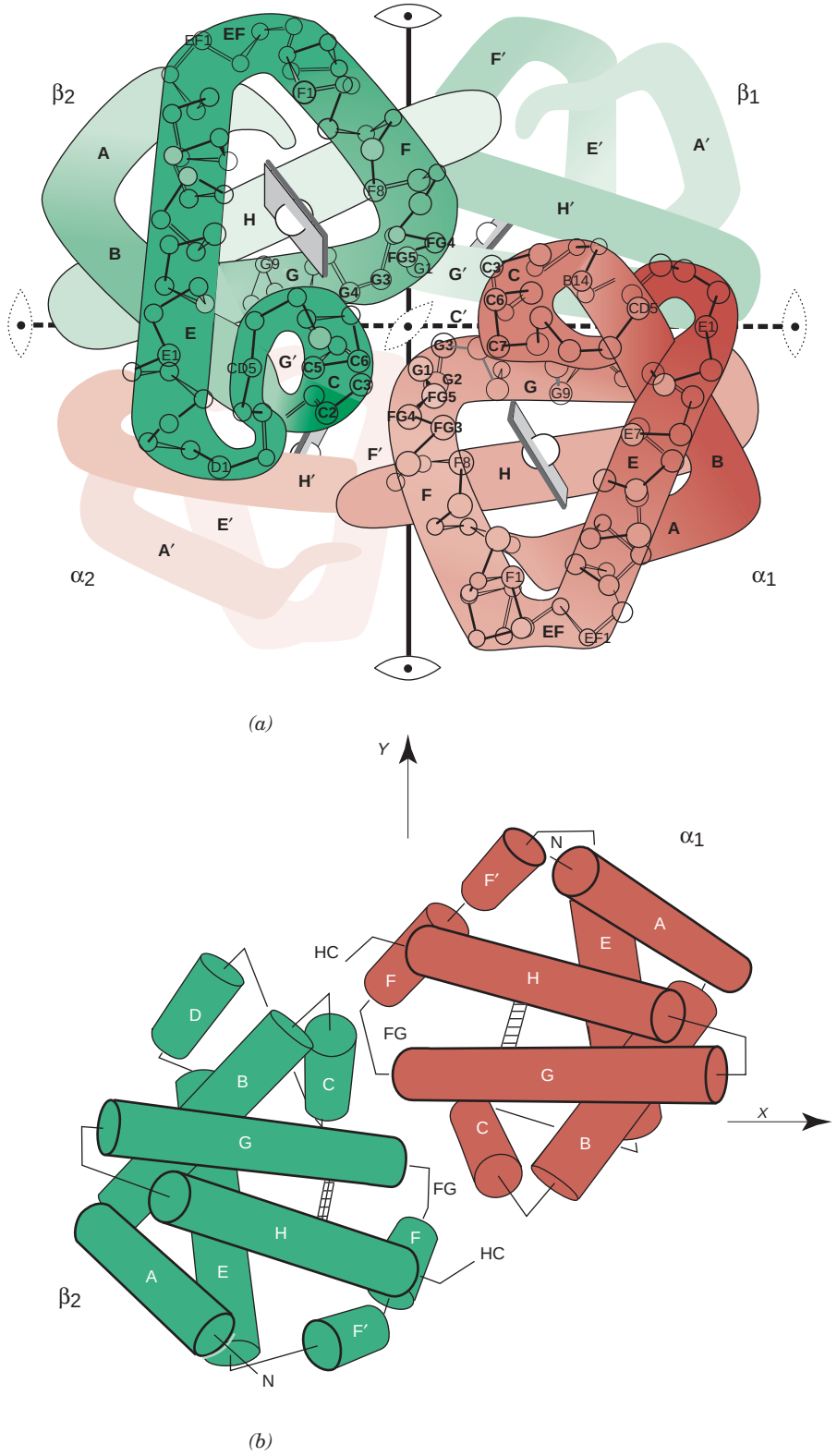


FIGURA 9.38
Estructura cuaternaria de la hemoglobina en la que muestran las interacciones extremo FG y hélice C a través de la interfase α_1–β_2.
(*a*) Contactos en la interfase α_1–β_2 entre los extremos FG y la hélice C. (*b*) Representación cilíndrica de las subunidades α_1 y β_2 en la molécula de hemoglobina; se muestran los contactos en la interfase entre α_1 y β_2 entre el extremo FG y la hélice C, vistos desde el otro lado del plano *xy* que en (*a*).
(a) Figura reproducida con permiso de R. E. Dickerson y I. Geis, The Structure and Action of Proteins. *Menlo Park, CA: Benjamin, Inc., 1969, p. 56.*
(b) Figura reproducida con permiso de J. Baldwin y C. Chothia, J. Mol. Biol. *179:175, 1979. Copyright © 1979 by Academic Press Inc. (London) Ltd.*

el extremo FG de una subunidad y la hélice C de la subunidad adyacente. La conmutación de las interacciones no covalentes entre las dos posiciones supone un movimiento relativo de FG y C de subunidades adyacentes de unos 6 Å. En la segunda posición del "conmutador", la conformación terciaria de las subunidades que participan en el contacto de FG y C entre subunidades está menos constreñida, y la subunidad adyacente cambia a una nueva conformación terciaria (conformación oxi), incluso sin O_2 fijado. Esta conformación oxi permite que las His-F8, al asociarse con el O_2, se acerquen a sus porfirinas con una repulsión estérica menos significativa que

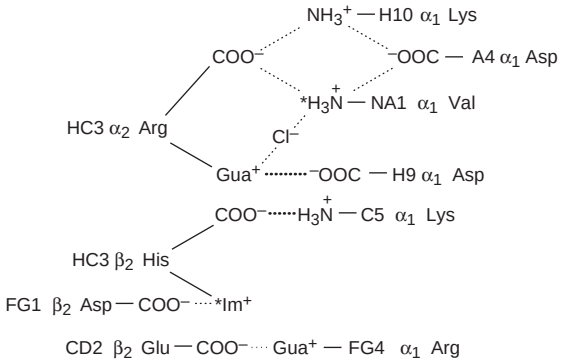


FIGURA 9.39
Enlaces salinos entre las subunidades de la desoxihemoglobina que se rompen en la oxihemoglobina.
Im^+ es el imidazolio; Gua^+ es guanidinio; los residuos con asterisco justifican aproximadamente el 60% del efecto Bohr alcalino.
Adaptado de M. Perutz, Brit. Med. Bull., *32:195, 1976.*

en la conformación desoxi (Figura 9.40). Así, la molécula de O_2 se puede fijar con más facilidad al hemo vacío en la conformación oxi, que es menos constreñida, que a la conformación de la subunidad mantenida por interacciones cuaternarias en la conformación desoxi. Además, interacciones iónicas estabilizan la conformación desoxi (Figura 9.39) pero se desestabilizan al unirse O_2 a uno de los hemos.

La conformación desoxi de la hemoglobina se denomina "tensa" o **estado conformacional T**. La conformación de la oxihemoglobina se denomina "relajada" o **estado conformacional R**. El mecanismo alostérico muestra cómo la fijación inicial del oxígeno a una de las subunidades hemo de la molécula tetramérica transforma la conformación molecular desde el estado T al R. La afinidad hacia el O_2 es mayor para los hemos en estado R que en el estado T, en un factor de 150 a 300, según las condiciones de la solución.

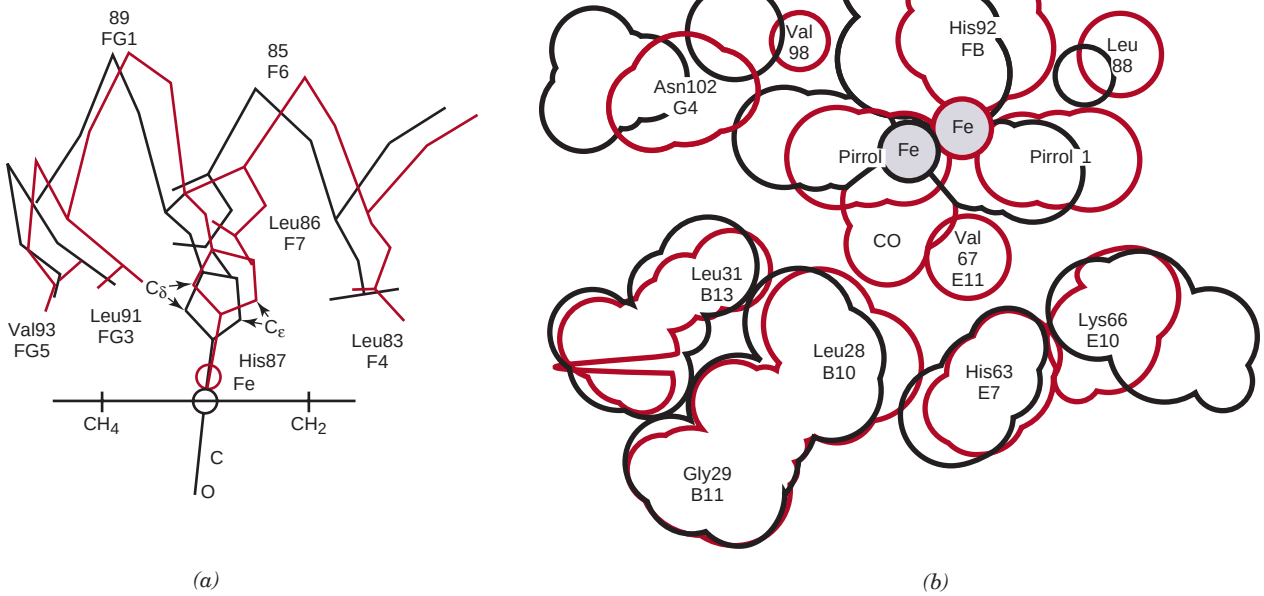


FIGURA 9.40
Diagramas de varillas y espacial dibujados por ordenador en los que se muestran los movimientos de los residuos en el entorno del hemo en la transición de desoxihemoglobina a oxihemoglobina.
(*a*) La línea negra resigue la posición de la cadena polipeptídica y de la His-F8 de la monóxido de carbono-hemoglobina, que se considera modelo de la oxihemoglobina, mientras que la línea roja hace lo propio con la desoxihemoglobina. La posición del átomo de hierro se muestra como un círculo. Estos movimientos corresponden a los de la subunidad α. (*b*) Se muestra el movimiento correspondiente de la subunidad β utilizando un diagrama espacial. El nombre de los residuos está en el centro de densidad de la conformación desoxi.
Adatado con permiso de Baldwin, J. y Chothia, C. J. Mol. Biol. *129:175, 1979.*
Copyright © 1979 by American Press, Inc. (London) Ltd

La hemoglobina facilita el transporte de CO_2 y de NO

La supervivencia de las células depende de la capacidad de la hemoglobina de los hematíes para llevar O_2 destinado al metabolismo celular y para facilitar el transporte del producto final del metabolismo celular, el CO_2, fuera de las células hacia los pulmones. Además, la hemoglobina fija el vasodilatador **NO** y lo libera en la pared de los capilares sanguíneos de los tejidos. El equilibrio conformacional entre T y R de la molécula de hemoglobina controla la liberación de O_2, CO_2 y NO por la hemoglobina en sus sitios de descarga adecuados. Además, el equilibrio T $\rightleftharpoons$ R está regulado por la concentración del ion hidrógeno, que liga la descarga de O_2 y de NO en los tejidos y el transporte de CO_2 lejos de los tejidos por la hemoglobina.

La disminución en el pK_a de grupos ácidos al cambiar de la conformación T a la R conduce a la disociación de protones

La Ec. (9.10) muestra la liberación de protones a medida que la **conformación T** se convierte en la **conformación R.** La liberación de protones a la sangre a medida que la conformación T cambia a la conformación R al pH sanguíneo se denomina **efecto Bohr** alcalino, el cual tiene importancia fisiológica

$$\underset{\text{T}}{\text{Hb}} + 4\text{O}_2 \rightleftharpoons \underset{\text{R}}{\text{Hb(O}_2)_4} + n\text{H}^+ \qquad \textbf{(9.10)}$$

El valor de *n* en la Ec. (9.10) (equivalentes de protones liberados cuando una molécula de desoxi-Hb se convierte en oxi-Hb) varía entre 1,2 y 2,7 según sean las condiciones de la solución y la concentración de ion cloruro y de **2,3-bisfosfoglicerato.** Según la ley de acción de masas, el aumento de la concentración de ion hidrógeno en el miembro a la derecha del signo de equilibrio de la Ec. (9.10) fuerza al equilibrio a ir hacia la izquierda, hacia un aumento de la concentración de desoxi-Hb y O_2 libre a fin de reestablecer la razón del equilibrio. Las células que realizan un metabolismo activo liberan ácido carbónico (CO_2 hidratado) y ácido láctico (véase p. 599), que incrementan la acidez del medio. El menor pH de la sangre (incremento en la concentración de H^+) fuerza el paso de oxi-Hb a desoxi-Hb y a la descarga de O_2 a las células. Este mecanismo es un bucle de retroalimentación, en el que el desecho metabólico celular (CO_2) induce el incremento de un sustrato clave (O_2) necesario para que continúe el metabolismo celular. La variación en la concentración de protones liga los dos procesos de descarga de O_2 y eliminación de CO_2 por la molécula de hemoglobina.

¿Por qué se disocian protones de la hemoglobina cuando la conformación T se transforma en la conformación R? Los protones se disocian cuando los grupos ácidos de las cadenas laterales de la molécula de hemoglobina son más ácidos en la conformación R que en la T. Esto requiere que el pK_a de estos grupos sea menor en la conformación R que en la T.

El grupo imidazolio de la His 146(β) es el principal contribuyente a la disociación de protones en la conversión de la conformación T a R. En la conformación T, la carga positiva sobre el imidazolio de la cadena lateral de la His 146(β) está formando un par iónico con la carga negativa del carboxilato de la cadena lateral del Asp 94(β) (Figura 9.41). El carboxilato cargado negativamente estabiliza el imidazolio cargado positivamente. Así, el imidazolio de la His 146(β) que forma par iónico con el carboxilato del Asp 94(β) en la conformación T tiene un pK_a superior al normal (aproximadamente 7,7). La conversión de la conformación de la hemoglobina a la conformación R rompe el par iónico entre Asp 94 e His 146 y coloca los dos residuos en posiciones nuevas en la conformación R en las que los dos grupos con cargas opuestas ya no pueden interaccionar. En consecuencia, en la conformación R, el imidazolio de la His 146(β) vuelve a un pK_a más normal de aproximadamente 7,3. El cambio en el pK_a de la His 146(β) a un valor más ácido al convertirse la Hb de la conformación T a la R produce la disociación de protones al pH de la sangre (~7,4). Aproximadamente el 50% de los protones que se disocian provienen del imidazolio de la His 146(β). Los otros protones disociados a causa del efecto Bohr provienen de otros grupos ácidos de la proteína que cambian su pK_a de manera similar desde unos valores más altos a otros más bajos cuando la conformación cambia de T a R.

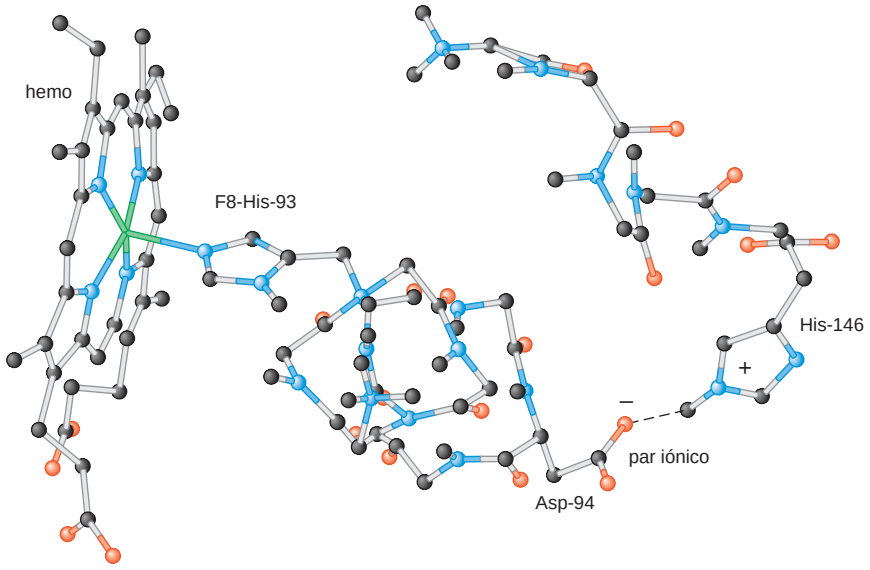


FIGURA 9.41
Par iónico entre los grupos imidazolio y carboxilato de las cadenas laterales de la His 146(β) y del Asp 94(β), respectivamente, en la conformación desoxi (T) de la hemoglobina.
Estructura parcial de la cadena β en la que se muestra el esqueleto polipeptídico de los aminoácidos 87 al 95 y del 142 al 146 de la cadena β en la conformación desoxi. Sólo se muestran las cadenas laterales de Asp 94, His 146 y la His 93 de F8 ligada al hemo de la subunidad β. Los átomos de oxígeno están en rojo, los de nitrógeno en azul y los de carbono e hidrógeno en negro. Se muestra el puente de hidrógeno (línea a trazos) entre el N-H cargado positivamente del imidazolio de His 146(β) y el oxígeno del carboxilato cargado negativamente del Asp 94(β).
Dibujo realizado con el Swiss-PdBViewer utilizando la estructura 1A3N del PDB.

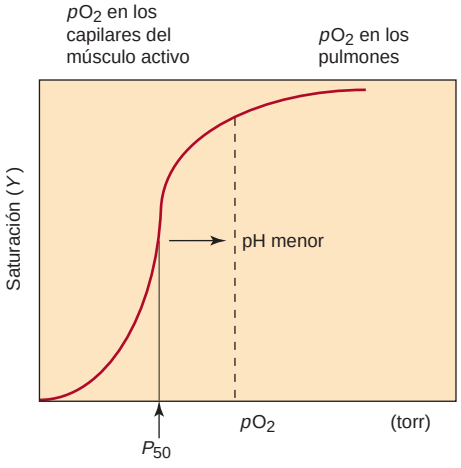


FIGURA 9.42
Variación en la curva de saturación de la hemoglobina por el oxígeno a un valor de P_{50} más elevado al disminuir el pH (aumento en la [H^+]).

En la Figura 9.42 se muestra la gráfica de la fracción de saturación de los sitios de fijación de O_2 de la hemoglobina frente a la concentración de O_2 para la Hb a diferentes valores de pH. A un pH más ácido (mayor [H^+]), la hemoglobina disocia su O_2 más fácilmente [Ec. (9.10)] y la curva se desplaza hacia la derecha de la curva obtenida a valores normales de pH. En consecuencia, el valor de P_{50} a valores de pH más ácidos es mayor que el valor a pH normal lo que refleja una menor afinidad de la hemoglobina por el O_2. En la dirección de pH opuesta, a un valor de pH superior al normal (menor [H^+]), la curva de asociación-disociación se desplaza hacia la izquierda de la curva a pH normal y el equilibrio de disociación O_2-Hb tiene un valor de P_{50} menor, lo que refleja una mayor afinidad del O_2 por la hemoglobina.

El efecto Bohr acopla el transporte de CO_2 desde los tejidos a los pulmones con el transporte de O_2 de los pulmones a los tejidos

Las células con metabolismo activo utilizan O_2 y producen CO_2. El CO_2 producido por las células difunde a la sangre circundante y entra en el hematíe. Allí el CO_2 se convierte rápidamente en ácido carbónico por el enzima **carbónico anhidrasa**. La conversión de CO_2 a ácido carbónico es una sencilla reacción de hidratación [Ec. (9.11)]

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \qquad \textbf{(9.11)}$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \qquad \textbf{(9.12)}$$

A su vez el ácido carbónico se disocia espontáneamente a HCO_3^- y un H^+ [Ec. (9.12)]. El HCO_3^- difunde fuera del hematíe y es transportado a los pulmones por el plasma (Figura 9.43). El transporte de CO_2 desde los tejidos a los pulmones

en forma de bicarbonato (HCO_3^-) se conoce como **transporte isohídrico**. Aproximadamente 70-80% del CO_2 producido por las células es transportado al pulmón mediante este mecanismo.

El ion hidrógeno que se disocia del ácido carbónico es un contribuyente principal al aumento de acidez de la sangre alrededor de los tejidos con un rápido metabolismo. Por suerte, el pH de la sangre no puede hacerse demasiado ácido gracias a la fijación de protones por la hemoglobina, según la Ec. (9.10). La fijación de protones a la hemoglobina también fuerza a $Hb(O_2)_4$ a que disocie su O_2 mediante el equilibrio de la Ec. (9.10). El O_2 difunde seguidamente desde los eritrocitos a las células. La hemoglobina participa, así, en la regulación del pH de la sangre al fijar los iones hidrógeno liberados del ácido carbónico. Los protones se fijan a la desoxi-Hb (H^+Hb) por grupos ácido/base de cadenas laterales, tales como las cadenas laterales de imidazol de las dos His 146(β) de la molécula de hemoglobina. La desoxi H^+Hb es transportada a los pulmones dentro de los hematíes.

En los pulmones, la elevada pO_2 promueve la conversión de la desoxi Hb (conformación T) a oxi Hb (conformación R). Al convertirse en oxi-Hb se disocian protones [Ec. (9.10)]. Los protones se combinan entonces con moléculas de HCO_3^-, que vuelven a difundir a los eritrocitos desde el plasma, para volver a formar ácido carbónico (H_2CO_3, inverso de la Ec. 9.12)). El enzima carbónico anhidrasa, que había catalizado la hidratación del CO_2 a H_2CO_3 en los tejidos, cataliza ahora la conversión del H_2CO_3 formado en los pulmones a CO_2 y H_2O (inverso de la Ec. (9.11)). El CO_2 difunde de la sangre a los alveolos pulmonares y se expira al aire (Figura 9.43).

Un segundo mecanismo de transporte de CO_2, que da cuenta del 15-20% del CO_2 transportado desde los tejidos a los pulmones, es la **carbamino-hemoglobina**. Este mecanismo de transporte utiliza la reacción espontánea del CO_2 con los grupos NH_2-amino terminales de las cadenas polipeptídicas de la Hb para formar carbamino-Hb [Ec. (9.13)]. Esta reacción también produce un H^+.

$$HbNH_2 + CO_2 \rightleftharpoons HbNHCO_2^- + H^+ \qquad \textbf{(9.13)}$$

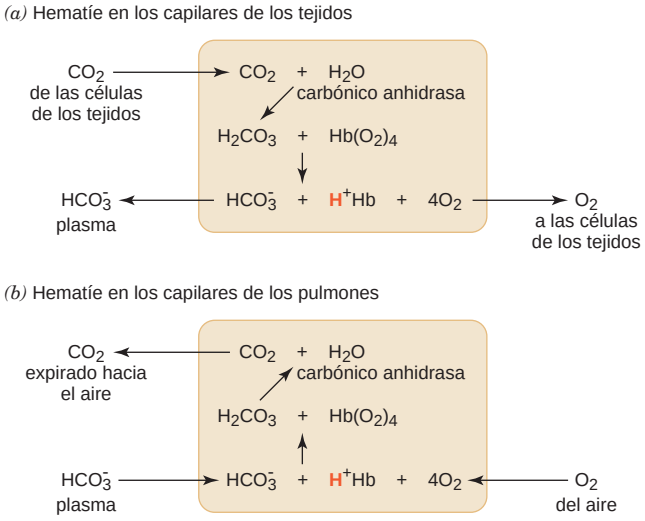


FIGURA 9.43
Transporte isohídrico del CO_2 en forma de bicarbonato.
(*a*) Reacciones en el hematíe a nivel de los tejidos. El CO_2 difunde al interior del hematíe desde los tejidos y se convierte en ácido carbónico mediante la carbónico anhidrasa. El ácido carbónico se disocia espontáneamente en H^+ y HCO_3^- [Ec. (9.12)]. El protón que se disocia del ácido carbónico (H^+ en rojo) se une a la desoxi-Hb forzando el equilibrio O_2-Hb desde la oxihemoglobina a la desoxihemoglobina [Ec. (9.10)] con disociación de O_2, el cual difunde al exterior del hematíe hacia los tejidos. El HCO_3^- difunde al exterior del hematíe y es transportado por el plasma al pulmón (fuera de la célula). (*b*) Reacciones en el hematíe al nivel del pulmón. En el pulmón, la elevada presión de O_2 fuerza las reacciones en el sentido contrario. Las reacciones son el inverso de las de los capilares.

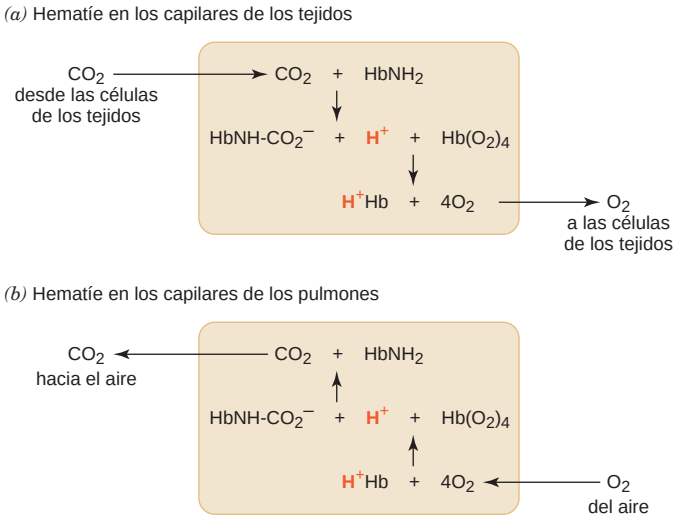


FIGURA 9.44
Transporte de CO_2 en forma de carbamino-hemoglobina.
(*a*) Reacciones en el hematíe a nivel de los tejidos. El CO_2 difunde al interior del eritrocito y reacciona con el grupo amino NH_2-terminal de las cadenas de hemoglobina formando carbamino-hemoglobina. La reacción libera un protón (H^+ en rojo), el cual promueve la disociación del O_2 de la hemoglobina. El O_2 difunde fuera del eritrocito hacia los tejidos.
(*b*) Reacciones en el eritrocito a nivel del pulmón. En el pulmón, la elevada presión de O_2 fuerza las reacciones en sentido opuesto, lo que conlleva la expiración de CO_2 desde el pulmón. Las reacciones son el inverso de las de los capilares.

El incremento en H^+ debido a la formación de carbamino-Hb promueve la disociación y descarga de O_2 a las células con un metabolismo activo [Ec. (9.10)]. En el pulmón, la elevada pO_2 genera la formación de oxi-Hb con disociación de H^+ [Ec. (9.10)]. El H^+ libre promueve la disociación del grupo carbamino de la Hb para volver a formar CO_2 (inverso de la Ec. (9.13)), que es expirado de los pulmones (Figura 9.44).

El 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) en los eritrocitos modula la disociación de oxígeno de la hemoglobina

Un importante modulador del equilibrio de la hemoglobina es el **2,3-bisfosfoglicerato (BPG)** (Figura 9.45). Un nombre químico alternativo para el BPG, que a menudo se encuentra en la bibliografía antigua, es **2,3-difosfoglicerato**, abreviado **DPG**. El BPG es un intermediario en una ruta menor del metabolismo de la glucosa se encuentra presente en pequeñas cantidades en todas las células. No obstante, en los eritrocitos es una ruta metabólica muy activa, y las concentraciones de BPG son aproximadamente equimolares a las de hemoglobina. El BPG tiene una afinidad hacia la conformación desoxi (T) de la hemoglobina mientras que no tiene afinidad hacia la conformación oxi (R). La fijación del BPG a la Hb estabiliza la conformación T, por lo que en presencia de BPG aumenta la concentración de la conformación T con respecto a la de R. Dado que el BPG sólo se une fuertemente a la conformación T, se disocia una molécula de BPG cuando la desoxi-Hb se convierte en oxi-Hb [Ec. (9.14)]

$$H^+BPG \cdot Hb + 4O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_4 + BPG + nH^+ \qquad \textbf{(9.14)}$$

El aumento en la concentración de BPG fuerza el equilibrio hacia la izquierda, con el fin de restablecer la razón de equilibrio de reactivos y productos. Por el contrario, concentraciones de BPG inferiores a la normal aumentan la concentración de la oxi-Hb con respecto a la desoxi-Hb y O_2 libre. Concentraciones elevadas de BPG modifican la gráfica de disociación del oxígeno-Hb hacia la derecha con aumento correspondiente en el valor de P_{50} (Figura 9.46). A concentraciones de BPG inferiores a la normal, el valor de P_{50} es menor que para la Hb normal con lo que la gráfica de saturación de oxígeno se desplaza hacia la izquierda de la gráfica de disociación oxígeno-Hb a concentraciones normales de BPG.

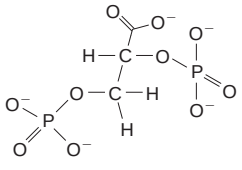


FIGURA 9.45
Estructura del 2,3-bisfosfoglicerato (BPG). La molécula tiene una carga de −5 a pH 7,4.

El BPG se une dentro de una bolsa de la molécula de hemoglobina formada en la interfase subunidad-β_1-subunidad-β_2. Este sitio contiene ocho grupos cargados positivamente [2 × His 143(β), 2 × Lys 82(β), 2 × His 2(β), 2 × amonio del aminoácido NH_2-terminal 1(β)] (Figura 9.47). La molécula de BPG contiene una carga de −5 (Figura 9.45) y es fuertemente atraída hacia las cargas positivas del sitio de fijación en la interfase β–β. En la conformación R de la hemoglobina, el tamaño de la bolsa de fijación disminuye, lo que da como resultado la incapacidad de la molécula de BPG para acoplarse fácilmente en la bolsa de fijación.

Las condiciones que producen hipoxia (deficiencia de oxígeno), tales como anemia, fumar y la altitud elevada, incrementan los niveles de BPG en los eritrocitos. A su vez, las condiciones que conducen a una hiperoxia dan como resultado concentraciones menores de BPG. Las variaciones de la concentración de BPG en los eritrocitos no son inmediatos, sino que tienen lugar durante horas y días para compensar cambios crónicos en los niveles de pO_2.

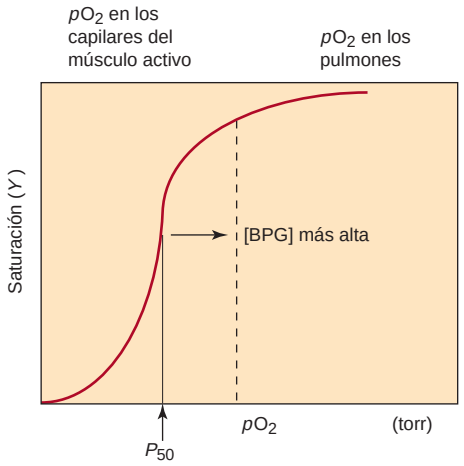


FIGURA 9.46
Variación en la curva de saturación de la hemoglobina por el oxígeno hacia un valor de P_{50} más elevado al aumentar la concentración de BPG.

La hemoglobina descarga óxido nítrico (NO) en la pared de los capilares de tejidos en los que promueve la descarga de O_2

La hemoglobina fija reversiblemente el **óxido nítrico** (NO) que es un potente vasodilatador con una vida muy corta en la sangre. Al fijar el NO, la hemoglobina secuestra las moléculas de NO impidiendo su destrucción rápida. La Hb se disocia del NO transfiriendo el NO ligado a pequeñas moléculas con grupos sulfhidrilo (X-SH)

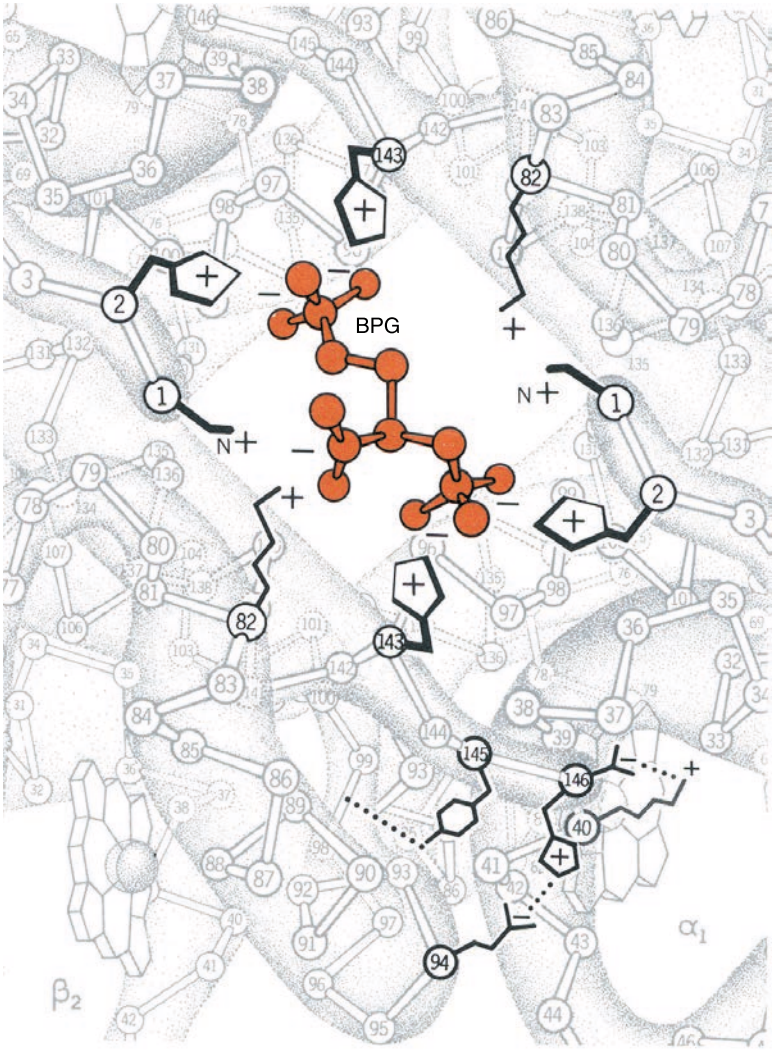


FIGURA 9.47
Sitio de unión del 2,3-bisfosfoglicerato en la interfase β–β de la desoxihemoglobina. Se muestran las cadenas laterales cargadas positivamente del amonio de dos Val 1(β) del extremo amino, el imidazol de la His 2(β), el ϵ-amonio de Lys 82(β) y el imidazol de His 143(β). El 2,3-bisfosfoglicerato (marcado BPG) cargado negativamente se une en el centro del anillo de grupos cargados positivamente. *Reproducido con permiso de R. E. Dickerson e I. Geis,* Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. *Menlo Park, CA: Benjamin-Cunnings, 1983. Ilustración de Irving Geis, Geis Archives Trust. Derechos propiedad del Howard Hughes Medical Institute.*

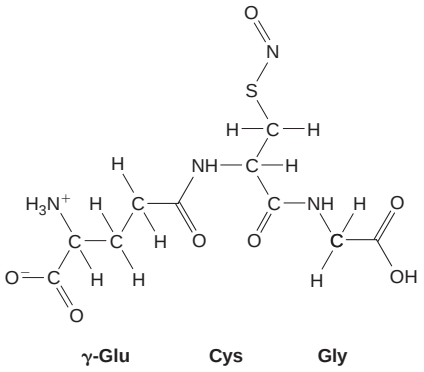


FIGURA 9.48
El transportador X-S-NO glutatión (γ-glutamil-cisteinil-glicina) transporta NO unido al sulfhidrilo de la cadena lateral de su cisteína.

cuando la hemoglobina pasa de la conformación oxi (R) a la conformación desoxi (T). Una molécula X-SH común es el glutatión (Figura 9.48). El NO liberado en forma de X-S-NO también estabiliza el NO contra su rápida degradación y permite la descarga eficiente de un equivalente de NO bioactivo (X-S-NO) a los receptores de NO en las células de la pared de los vasos sanguíneos, promoviendo la relajación de la pared vascular. Esto facilita la transferencia de gases entre la sangre y las células de los tejidos. La concentración molar de NO en la sangre es 1/70 de la concentración de Hb. Sin embargo, la baja concentración de NO es fisiológicamente significativa debido a la potente actividad biológica del NO (X-S-NO).

El NO es capturado en primer lugar por el Fe^{2+} en los sitios hemo y, en segundo lugar, es transferido al sulfhidrilo (átomo de S) de los residuos de cisteína 93 de las cadenas β (βCys^{93}). El hierro del hemo une preferentemente el NO cuando está en la conformación T. El NO se transfiere desde los sitios de fijación en el hemo a la βCys^{93} cuando la hemoglobina se encuentra en la conformación R. Seguidamente, cuando la conformación R cambia de nuevo a la conformación T para descargar el O_2 a los tejidos, la βCys^{93}-S-NO transfiere el NO a pequeñas moléculas X-SH tales como el glutatión (Figuras 9.48 y 9.49). El efecto neto es la catálisis por la hemoglobina de la conversión de NO libre e inestable a X-S-NO estable para poder descargar el potente vasodilatador a las dianas en los vasos sanguíneos cuando es necesario.

La Figura 9.50 muestra la región de la proteína hemoglobina que contiene la βCys^{93}-S-NO modificada. En la conformación T la cadena lateral S-NO de la βCys^{93} se encuentra en el exterior de la molécula y es accesible a las moléculas de glutatión. Esto permite la *trans*-nitrosilación entre moléculas de βCys^{93}-S-NO y X-SH en solución. Por el contrario, en la conformación R la βCys^{93}-SH apunta hacia el hierro del hemo y es inaccesible al disolvente exterior. En la posición sepultada de la conformación R, la distancia es óptima para la transferencia del NO desde su sitio de fijación de hierro del hemo a la βCys^{93}-SH. Así, los cambios de conformación en la molécula de hemoglobina, inducidos por los cambios en la presión de oxígeno entre los pulmones y los tejidos, regulan la captación de NO y su liberación desde la βCys^{93}. El efecto neto es la descarga de NO bioactivo a los capilares de los tejidos con baja tensión de oxígeno.

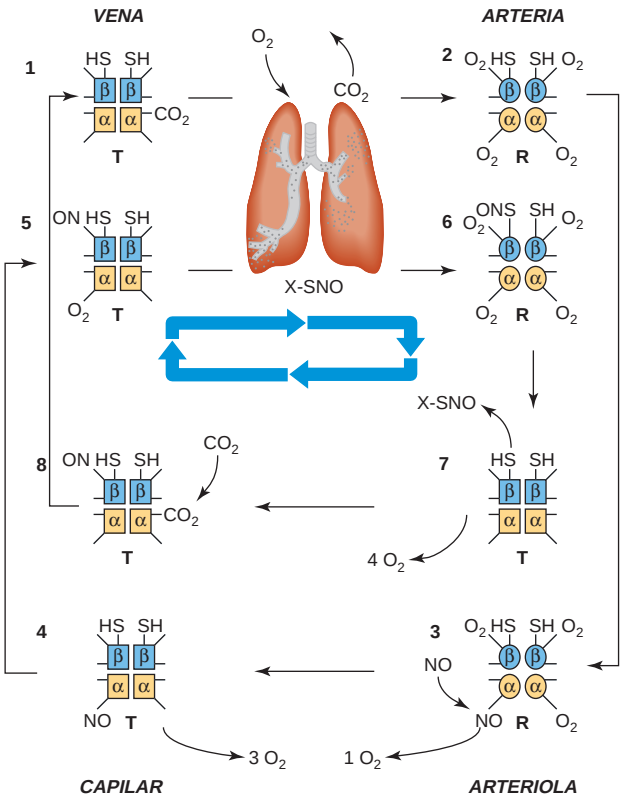
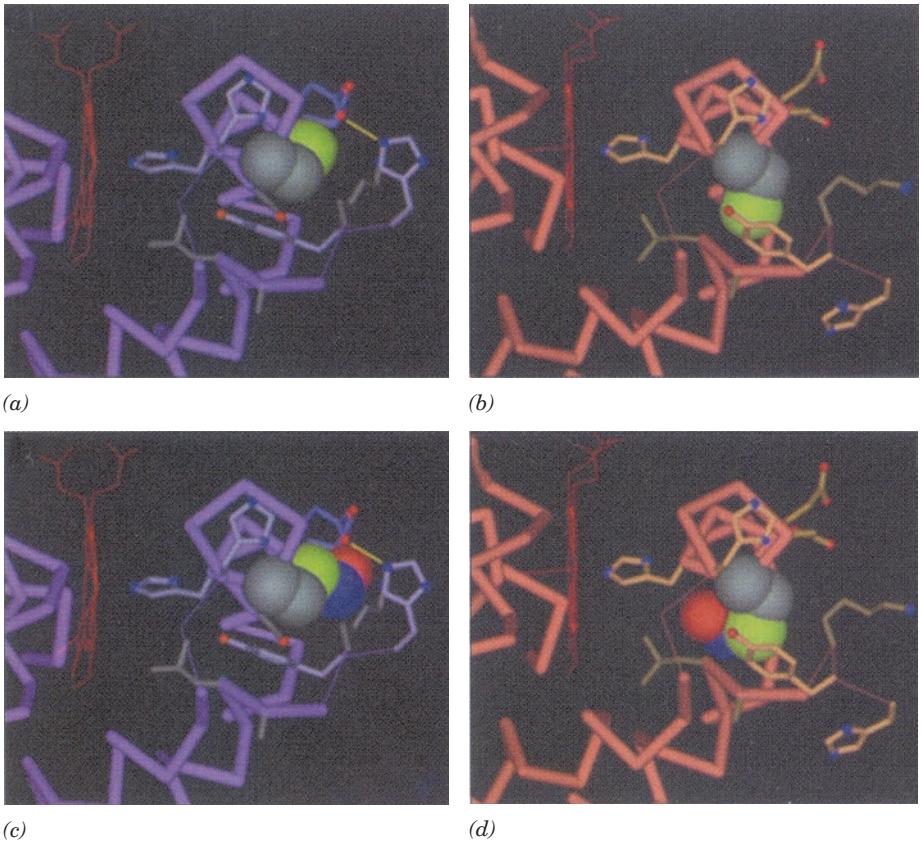


FIGURA 9.49
Fijación y liberación de NO por la hemoglobina durante el ciclo respiratorio. El modelo muestra la unión y disociación de NO, O_2 y CO_2 mientras una molécula de hemoglobina realiza dos ciclos completos a través de la circulación. El primer ciclo implica los intermediarios 1–4 y el segundo los intermediarios 5–8. Se muestran las conformaciones T y R y los grupos SH provienen de la cadena lateral de βCys^{93}. El NO se une directamente al hierro de un hemo o al SH de la βCys^{93}. Los pasos clave en el transporte de NO son su unión inicial a un hemo en el intermediario 3 y su transferencia desde el hemo de una subunidad β a la βCys^{93} en el intermediario 6 (conformación R) y su transferencia a un tiol molecular pequeño X-SH en el intermediario 7 (conformación T) cuando la hemoglobina pasa de la forma R a la T. La molécula de hemoglobina dibujada puede ser solamente una de cada 1000 moléculas de hemoglobina que se están ciclando, debido a la baja concentración molar relativa del NO en la sangre.
Adaptado de S. S. Gross y P. Lane. Proc. Acad. Natl. Sci. USA *96:9967, 1999.*



(a) *(b)* *(c)* *(d)*

FIGURA 9.50
Estructura de βCys^{93} y βCys^{93}-S-NO en las conformaciones T y R.

En todas las estructuras el canto del hemo (en rojo) apunta hacia el lector y se muestra unido al imidazol de la histidina próxima. Los dos carbonos (gris) y azufre (amarillo verdoso) de la cadena lateral de la Cys 93 se muestran mediante modelos espaciales. En los paneles (*c*) y (*d*) el NO está unido al azufre de la βCys^{93} con el átomo de N de color azul y el átomo de O en rojo. (*a*) Conformación desoxi (T) con la cadena lateral de la βCys^{93} ($—CH_2—SH$) sobre la superficie de la molécula lejos del hemo. La cadena lateral de cisteína no puede entrar en el sitio de fijación de hemo a causa del par iónico unido por puente de hidrógeno entre el imidazolio de la βHis^{146} y el carboxilato del βAsp^{94} en el extremo superior derecho y detrás del SH de la cadena lateral de βCys^{93}. (*b*) La conformación oxi (R) con la cadena lateral de la βCys^{93} apuntando hacia el hemo y alejándose del disolvente del exterior de la molécula. El puente salino entre βHis^{146} y βAsp^{94} está roto en la conformación R, la cual permite el pliegue de la βCys-SH hacia la bolsa del hemo. (*c*) Modelo de la βCys^{93}-SNO en la conformación desoxi (T). El SNO está colocado en el exterior, accesible a la reacción con moléculas pequeñas del tipo X-SH del disolvente. Al igual que en (*a*) la cadena lateral de la cisteína no puede entrar en el sitio del hemo a causa del par iónico βHis^{146} - βAsp^{94}. (*d*) Modelo de βCys^{93}-SNO en la conformación oxi (R). El SNO está sepultado cerca del hemo y lejos del solvente exterior. Esta conformación facilita la transferencia de NO desde el hierro del hemo al SH de la cisteína e impide la reacción de βCys^{93}-SNO con moléculas X-SH del disolvente.

Reproducido con permiso de J. S. Stamler, L. Jia, J. P. Eu, T. J. McMahon, I. T. Demchenko, J. Bonaventura, K. Gernet y C.A. Piantadosi Science*276:2034, 1997. Copyright © 1996 by the American association for the Advancement of Science.*

BIBLIOGRAFÍA

Inmunoglobulinas

Alzari, P. M., Lascombe, M.-B. y Poljak, R. J. Structure of antibodies, *Annu. Rev. Immunol*, 6:555, 1988.

Barclay, A.N. Ig-like domains: evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:14672, 1999.

Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M. y Poljak, R. J. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions, *Nature* 342:877, 1989.

Davies, D. R., Padlan, E. A. y Sheriff, S., Antibody–antigen complexes. *Acc. Chem. Res.* 26:421, 1993.

Guddat, L. W., Shan, L., Fan, Z.-C., Andersen, K. N., Rosauer, R., Linthicum, D. S. y Edmundson, A. B. Intramolecular signaling upon complexation. *FASEB J*. 9:101, 1995.

Hunkapiller, T. y Hood, L. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv. Immunol*. 44:1, 1989.

Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol*. 31:169, 1994.

Rini, J. M., Schultze-Gahmen, U., Wilson, I. A. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody–antigen recognition. *Science* 255:959, 1992.

Serina proteasas

Birk, Y. Proteinase inhibitors. En: A. Neuberger y K. Brocklehurst (Eds.), *Hydrolytic Enzymes*, Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 257.

Liebman, M. N. Structural organization in the serine proteases. *Enzyme* 36:115, 1986.

Neurath, H. Proteolytic processing and physiological regulation, *Trends Biochem. Sci.* 14:268, 1989.

Perona, J. J. y Craik, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4:337, 1995.

Polgar, L. Structure and function of serine proteases. En: A. Neuberger y K. Brocklehurst (Eds.), *Hydrolytic Enzymes*, series in *New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 16, Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 159.

Proteínas de unión a DNA

Bewley, C.A., Gronenborn, A. M. y Clore, G.M. Minor groove-binding architectural proteins: structure, function and DNA recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:105, 1998.

Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. y Pavletich, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor–DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265:346, 1994.

Choo, Y. y Klug, A. Physical basis of a protein-DNA recognition code. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:117, 1997.

Ghosh, G., Van Duyne, G., Ghosh, S. y Sigler, P. B. Structure of NF-*κ*B p50 homodimer bound to a *κ*B site. *Nature* 373:303, 1995.

Landschulz, W. H. Johnson, P. F. y McKnight, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759, 1988.

Lee, M. S., Gippert, G. P., Soman, K. V., Case, D. A. y Wright, P. E. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA- binding domain. *Science* 245:635, 1989.

Nikolov, D. B., Chen, H., Halay, E. D., Usheva, A. A., Hisatake, K., Lee, D. K., Roeder, R. G. y Burley, S. K. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377:119, 1995.

Pavletich, N. P. y Pabo, C. O. Zinc finger—DNA Recognition: Crystal structure of a Zif-268-DNA complex at 2.1 *A. Science* 252:809, 1991.

Hemoglobina

Página web de interés: The Globin Server database of sequence alignments and experimental results for the *β*-like gene cluster of mammals. http://globin.cse.psu.edu/

Baldwin, J. y Chothia, C. Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.* 129:175, 1979.

Dickerson, R. E. y Geis, I. *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology*, Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1983.

Gross, S. S. y Lane, P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9967, 1999.

Hsia, C.C.W. Mechanisms of disease: respiratory function of hemoglobin. *N. Engl. J. Med.*338:239, 1998.

Perutz, M. Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* 239:92, 1978.

Perutz, M. F., Fermi, G. y Shih, T.-B. Structure of deoxy cowtown [His HC3(146)*beta* to Leu]: origin of the alkaline Bohr effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:4781, 1984.

Perutz, M. F., Wilkinson, A. J. Paoli, M. y Dodson, G. G. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:1, 1998.

Veeramacheni, N. K., Harken, A. N. y Cairns, C. B. Clinical implications of hemoglobin as a nitric oxide carrier. *Arch. Surg.* 134:434, 1999.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Los haptenos:
   A. pueden funcionar como antígenos.
   B. se unen fuertemente a los anticuerpos específicos para ellos.
   C. pueden ser macromoléculas.
   D. nunca actúan como determinantes antigénicos.
   E. pueden estimular directamente la producción de anticuerpos específicos.

2. En la estructura tridimensional de las inmunoglobulinas:
   A. las hojas *β* se alinean borde con borde.
   B. en cada cadena (H y L) las regiones C y V se pliegan una sobre otra, formando asociaciones *C*–V.
   C. las asociaciones C_L–V_L forman los sitios complementarios para la unión del antígeno.
   D. los grupos —SH libres están conservados para que contribuyan a la formación de enlaces covalentes fuertes con los antígenos.
   E. los dominios bisagra conectan dominios globulares.

3. ¿Cuáles de los siguientes aminoácidos se encuentran en los sitios activos de todas las serina proteasas
   A. asparagina.
   B. *γ*-carboxiglutamato.
   C. histidina.
   D. lisina o arginina.
   E. treonina.

Para las preguntas 4-7, referirse a lo siguiente:

   A. hélice–giro–hélice.
   B. cremallera de leucina.
   C. dedo de zinc.
   D. "silla de montar" de dos dominios de hojas *β* plegadas.
   E. pliegue de la inmunoglobulina.

4. No es un motivo de unión a DNA.
5. Motivo en la proteína de unión a TATA (TBP).
6. Contiene una sola hélice *α*.
7. Dos hojas *β* plegadas alineadas cara a cara.

8. Tanto la hemoglobina como la mioglobina presentan las siguientes características, a EXCEPCIÓN de:
   A. están formadas por subunidades diseñadas para suministrar puentes de hidrógeno a la interacción no polar con las otras subunidades.
   B. poseen una cantidad elevada de hélice *α*.
   C. unen una molécula de hemo por cadena de globina.
   D. unen el hemo en una bolsa hidrofóbica.
   E. pueden unir un O_2 por hemo.

9. Se cree que todos los factores siguientes contribuyen a la estabilización de la forma T o desoxi de la hemoglobina, a EXCEPCIÓN de:
   A. el radio iónico que es más grande en el ion ferroso hexacoordinado que en el ion pentacoordinado.
   B. la interacción estérica no tensionada de la His-F8 con el anillo de porfirina cuando el hierro está por encima del plano.
   C. las interacciones entre la región FG de una subunidad y la hélice C de la subunidad adyacente.
   D. interacciones iónicas.

10. Cuando la hemoglobina se convierte de la forma desoxi en oxihemoglobina:
    A. se hace más ácida y libera protones.
    B. se promueve la formación de carbamino.
    C. la fijación de BPG queda favorecida.
    D. se transfiere el NO unido al glutatión.
    E. todas las respuestas anteriores son correctas.

Preguntas 11 y 12: Las inmunoglobulinas (moléculas de anticuerpo) son una familia de proteínas producidas en respuesta a la invasión de sustancias extañas que inician un proceso mediante el que la sustancia extaña puede ser eliminada del organismo. La unión de los anticuerpos a los antígenos de la membrana celular del organismo invasor, como por ejemplo bacterias, activa la cascada del complemento. La activación del sistema del complemento conduce a la producción de proteínas que estimulan la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos. Un individuo con una deficiencia de inmunoglobulinas o con una deficiencia de una de las proteínas del complemento es susceptible de sufrir infecciones recurrentes.

11. En las inmunoglobulinas todo lo siguiente es cierto EXCEPTO:
    A. hay cuatro cadenas polipeptídicas.
    B. existen dos copias de cada tipo de cadena.
    C. todas las cadenas están unidas por enlaces disulfuro.
    D. existe glúcido unido de manera covalente a la proteína.
    E. la clase de inmunoglobulina está determinada por las regiones C_L

12. La IgG:
    A. se encuentra principalmente en las secreciones de las mucosas.
    B. es el primer anticuerpo producido cuando se introduce un antígeno extaño en el plasma del huésped.
    C. tiene la mayor masa molecular de todas las inmunoglobulinas.
    D. contiene glúcido unido covalentemente a la cadena H.
    E. juega un papel importante en las respuestas alérgicas.

Preguntas 13 y 14: Cuando se lesiona un vaso sanguíneo, se inicia el proceso de coagulación para impedir la pérdida de sangre y mantener la integridad del sistema circulatorio. La coagulación es un proceso en el que se convierten zimógenos en serina proteasas activas en un proceso de cascada escalonada que finalmente da lugar al coágulo entrecruzado de fibrina. En un infarto de miocardio se puede activar el proceso en una medida tal que disminuye el flujo de sangre al músculo cardíaco. La ruta de la fibrinólisis para disolver los coágulos de fibrina también implica la activación de zimógenos para dar serina proteasas activas cuya etapa final es la activación del plasminógeno a plasmina, la cual actúa directamente sobre el coágulo de fibrina. Uno de los tratamientos habituales en el infarto de miocardio es la rápida administración de t-PA (activador tisular de plasmina); de hecho se utiliza t-PA recombinante obtenida por tecnología de clonación del gen.

13. Las serina proteasas:
    A. hidrolizan enlaces peptídicos que contienen grupos carboxilo procedentes de residuos de serina.
    B. se caracterizan porque tienen diversos sitios activos por molécula, con un residuo de serina en cada uno de ellos.
    C. se inactivan por reacción con una molécula de diisopropilfluorofosfato por molécula de proteína.
    D. son exopeptidasas.
    E. sólo reconocen los aminoácidos que intervienen en el enlace que ha de ser roto.

14. Todas las siguientes son características de las serina proteasas como clase EXCEPTO:
    A. sólo un residuo de serina es catalíticamente activo
    B. los sustratos proteicos naturales y los inhibidores se unen muy fuertemente a la proteasa.
    C. los genes que las codifican están organizados de manera análoga.
    D. las unidades catalíticas contienen dos dominios de tamaño muy diferente.
    E. la conversión del zimógeno en enzima activo requiere normalmente una o más reacciones hidrolíticas.

Problemas

15. Una de las adaptaciones a altitudes elevadas es un incremento en la concentración de BPG. ¿Qué efecto tiene este hecho sobre una curva de saturación respecto a la pO_2? ¿Por qué el incremento de [BPG] aumenta la descarga de O_2 a los tejidos?

16. ¿De qué modo la hidrólisis de una molécula de inmunoglobulina con papaína confirmó que V_L-V_H comprende el sitio antigénico de una inmunoglobulina?

17. Tanto la mioglobina como la hemoglobina constan de una globina (proteína) unida a un grupo prostético hemo. Un grupo hemo fija un O_2. ¿Por qué la curva de saturación de oxígeno (saturación frente a pO_2) de la mioglobina es una hipérbola rectangular mientras que la de la hemoglobina es sigmoidea?

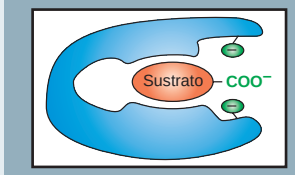
RESPUESTAS

1. **B** Los haptenos son pequeñas moléculas que aisladas son incapaces de estimular la producción de anticuerpos, por lo que no son antígenos. Pueden actuar como determinantes antigénicos si se unen covalentemente a una molécula grande, y así los haptenos libres pueden unirse fuertemente a los anticuerpos producidos de este modo.
2. **E** Véase la Figura 9.2. A: las hojas β se alinean cara a cara. B: las regiones V y C son adyacentes entre sí. C: las regiones de complementariedad son las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras [V(H)–V(L)]. D: la unión del antígeno no es covalente.
3. **C** La histidina participa en el mecanismo catalítico. A: Está involucrado un aspartato, y no una asparagina. B: El γ-carboxiglutamato es esencial en algunas serina proteasas, pero no se encuentra en el sitio activo. D: Estos son los sustratos específicos de algunas proteasas de tipo tripsina. E: ésta no está implicada.
4. **B** La cremallera de leucina une dos subunidades de un modo "cabeza con cabeza" pero ella misma no interacciona con el DNA.
5. **D** La silla en caja sobre la doble hélice de DNA en la secuencia TATA.
6. **C** El dedo de zinc tiene una hélice α y una hoja β unidas por un bucle.
7. **E** Esta estructura se encuentra en las inmunoglobulinas, pero también en otras proteínas, como, por ejemplo, ciertos factores de transcripción.
8. **A** La hemoglobina tiene cuatro cadenas y cuatro sitios de unión de oxígeno, mientras que la mioglobina posee una única cadena y un solo sitio de unión de oxígeno. Cada uno de estos sitios de unión es un hemo.
9. **A** El ion ferroso hexacoordinado tiene un radio iónico más pequeño que el de la especie pentacoordinada y encaja exactamente, sin producir distorsión, en el centro del anillo porfirínico.
10. **A** La histidina cargada positivamente ya no está estabilizada por la proximidad muy cercana del grupo carboxilato de un aspartato. Este es el efecto Bohr. B: el aumento de H^+ favorece la disociación de grupos carbamino, lo cual sucede en el pulmón. C: El BPG no se une de manera efectiva a la oxihemoglobina porque la bolsa de unión es damasiado pequeña. D: En la oxihemoglobina, el NO está unido a una cisteína y es transferido al glutatión cuando se libera el O_2 (la forma R vuelve a la forma T).
11. **E** Las regiones C_H determinan la clase. A: Existen dos copias de cada uno de los tipos de cadena polipeptídica.

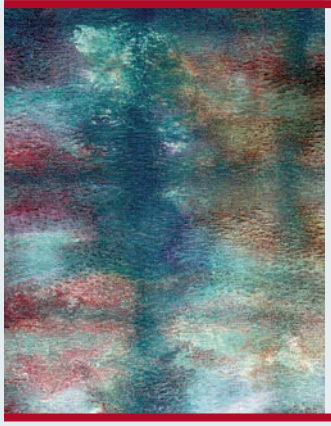
12. **D** Todas las inmunoglobulinas son glucoproteínas. A: IgA está asociada con las secreciones mucosas. B: IgM es la que aparece primero; IgG tarda más en aparecer pero finalmente se encuentra a concentración superior. D: IgM tiene la masa molecular más elevada. E: La IgE juega un papel importante en la respuesta alérgica.
13. **D** Esta es la característica distintiva de las serina proteasas, y de las serina hidrolasas en general. A: Poseen diversas especificidades. B: Sólo existe un sitio activo por molécula. D: Todas son endopeptidasas. E: Un "sitio activo extendido" que contiene el enlace hidrolizable y unos cuatro aminoácidos a cada lado son responsables de la especificidad.
14. **D** Los dominios tienen aproximadamente el mismo tamaño.
15. La unión de BPG a la hemoglobina estabiliza la conformación T, por lo que para una cantidad determinada de O_2, se fijará menos O_2 a la hemoglobina. Esto desplaza la curva de saturación hacia la derecha y aumenta P_{50}. (Verifíquelo Vd. mismo dibujando la curva). El equilibrio mostrado ilustra el hecho que el incremento de BPG provoca la liberación de O_2, lo cual tiene que suceder para que el O_2 entre en los tejidos.

$$H^+BPG \cdot Hb + 4O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_4 + BPG + nH^+ \qquad \textbf{(9.14)}$$

16. La papaína hidroliza en la región bisagra dando dos productos idénticos, F_{ab}, que están constituidos por la región N-terminal de la cadena H más la cadena L completa. Estos son dominios variables V_L y V_H. El tercer producto, F_c, es la porción C-terminal de las dos cadenas pesadas unidas covalentemente. F_{ab} fija antígeno con la misma afinidad que la molécula completa, mientras que F_c no tiene afinidad para la fijación de antígeno. Si F_{ab} se separa en sus dos cadenas (una L y una parte de la H), ninguna de las cadenas aisladas puede fijar antígeno. Por tanto, el sitio de fijación de antígeno requiere que tanto V_L como V_H funcionen conjuntamente.
17. La mioglobina es un monómero con una globina y un hemo que unen O_2. La unión de O_2 es un equilibrio sencillo con un coeficiente de Hill de 1. La hemoglobina es un tetrámero con cuatro O_2 unidos a los cuatro hemos. La hemoglobina sin oxígeno se encuentra en la conformación T en la que la unión del O_2 es difícil. De este modo la curva se inicia con un pequeño aumento al aumentar pO_2. La fijación del primer O_2 desplaza la conformación de la molécula completa favoreciendo la forma R, que fija el O_2 más fácilmente. Así, la pendiente se eleva de manera abrupta dándole su forma sigmoidea. Esto es un ejemplo de cooperatividad. El coeficiente de Hill para la hemoglobina es de 2,8.



10



ENZIMAS: CLASIFICACIÓN, CINÉTICA Y CONTROL

J. Lyndal York

10.1 CONCEPTOS GENERALES 414

10.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS 415

Clase 1: Oxidorreductasas 416
Clase 2: Transferasas 417
Clase 3: Hidrolasas 417
Clase 4: Liasas 418
Clase 5: Isomerasas 418
Clase 6: Ligasas 418

10.3 CINÉTICA 418

La cinética estudia la velocidad de transformación de los reactivos en productos 418
La ecuación de velocidad 419
- Caracterización de las reacciones según el orden 419
- Reversibilidad de las reacciones 420

Los enzimas presentan cinética de saturación 421
- Terminología 421
- Interacción de enzima y sustrato 421
- Formulación de la ecuación de Michaelis–Menten 422
- Significado de la K_m 423
- Forma lineal de la ecuación de Michaelis–Menten 424

Un mismo enzima cataliza las direcciones directa e inversa de una reacción reversible 424
Las reacciones multisustrato siguen un mecanismo ping–pong o bien un mecanismo secuencial 425

10.4 COENZIMAS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN 426

La adenosina trifosfato puede ser tanto un segundo sustrato como un modulador de la actividad 426
El NAD y el NADP son coenzimas de ácido nicotínico 426
El FMN y el FAD son coenzimas de riboflavina 427
Los cofactores metálicos tienen diversas funciones 428
- Papel del metal como elemento estructural 428
- Papel de los metales en la oxidación y la reducción 430

10.5 INHIBICIÓN DE LOS ENZIMAS 431

La inhibición competitiva puede compensarse con el incremento en la concentración de sustrato 431
Los inhibidores no competitivos no impiden la unión de sustrato 432
La inhibición irreversible requiere una modificación covalente de un sitio del enzima 433
Muchos fármacos son inhibidores enzimáticos 434
- Sulfamidas 434
- Metotrexato 435
- Antimetabolitos no clásicos 435
- Otros antimetabolitos 435

10.6 CONTROL ALOSTÉRICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 436

Los efectores alostéricos se unen a sitios diferentes de los sitios de fijación de sustrato 436
Los enzimas alostéricos presentan cinética sigmoidea 437
La cooperatividad explica la interacción entre los centros de unión de ligando en una proteína oligomérica 438
Las subunidades reguladoras modulan la actividad de las subunidades catalíticas 440

10.7 ESPECIFICIDAD ENZIMÁTICA: EL CENTRO ACTIVO 440

La complementariedad entre el sustrato y el enzima explica la especificidad de sustrato 441
- Asimetría del centro de fijación 441

10.8 MECANISMO DE CATÁLISIS 443

Los enzimas disminuyen la energía de activación 444
- Catálisis ácido–básica 444
- Tensión sobre el sustrato 445
- Catálisis covalente 446
- Estabilización del estado de transición 448
- Efectos entrópicos 449
- Desestabilización del estado basal 450

Los abzimas son anticuerpos con actividad catalítica que se han sintetizado artificialmente 450
Los parámetros ambientales influyen en la actividad catalítica 450
- Temperatura 451
- pH 451

10.9 APLICACIONES CLÍNICAS DE LOS ENZIMAS 452

En los análisis de actividad acoplados se utilizan las propiedades ópticas del NAD, NADP o FAD 453
Los analizadores clínicos utilizan enzimas inmovilizados como reactivos 455
Los inmunoensayos unidos a enzima utilizan enzimas como indicadores 456
La medición de isozimas se utiliza para el diagnóstico 456
Algunos enzimas se utilizan como agentes terapéuticos 458
Los enzimas unidos a matrices insolubles se utilizan como reactores químicos 459

10.10 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 459

BIBLIOGRAFÍA 460

PREGUNTAS 460

RESPUESTAS 462

APLICACIONES CLÍNICAS

10.1 Un caso de gota demuestra la existencia de dos fases en el mecanismo de acción enzimático 423
10.2 Efecto fisiológico de las variaciones en el valor de la K_m de un enzima 423
10.3 La mutación en un centro de fijación de un coenzima da lugar a una enfermedad clínica 426
10.4 Diseño de un inhibidor selectivo 432
10.5 Un caso de envenenamiento 435
10.6 Un caso de gota demuestra la diferencia entre un centro alostérico y el centro de fijación de sustrato 437
10.7 La labilidad térmica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa produce anemia hemolítica 451
10.8 Isozimas de la alcohol deshidrogenasa con diferente pH óptimo 452
10.9 Identificación y tratamiento de una deficiencia enzimática 454
10.10 Ambigüedad en el análisis de enzimas mutados 454

10.1 CONCEPTOS GENERALES

Los enzimas son proteínas que tienen la función de acelerar reacciones químicas en sistemas biológicos. Muchas reacciones necesarias para las células vivas no se producirían con la suficiente rapidez a la temperatura y pH del cuerpo sin enzimas. El término que define la rapidez a la que se produce una reacción química, catalizada o no, es la **velocidad**. La velocidad se define como el cambio en la cantidad (moles) de materiales iniciales o de productos por unidad de tiempo. Los enzimas incrementan la velocidad actuando como catalizadores. Un **catalizador** incrementa la velocidad de la reacción química, pero sin cambiar él mismo durante el proceso. El enzima puede unirse temporalmente de forma covalente a la molécula que se está transformando durante los pasos intermedios de la reacción, pero al final de la misma el enzima se regenera en su forma original al liberarse el producto.

Dos características importantes de la catálisis enzimática son que el enzima no se modifica como resultado de la misma y que éste no modifica la constante de equilibrio de la reacción, sino que incrementa sencillamente la velocidad a la que la reacción se aproxima al equilibrio. Como se tratará más adelante, el enzima consigue el incremento de velocidad disminuyendo la barrera de la reacción, esto es, disminuyendo la energía de activación. Por tanto, un catalizador aumenta la velocidad pero no cambia las propiedades termodinámicas del sistema con el que está interaccionando.

Antes de entrar a tratar el tema del mecanismo de la acción enzimática es necesario definir varios términos. Un **apoenzima** es la parte proteica del enzima desprovista de los cofactores o grupos prostéticos que puedan ser necesarios para que el enzima sea funcionalmente activo. El apoenzima es catalíticamente inactivo. No todos los enzimas requieren cofactores o grupos prostéticos. Los **cofactores** son moléculas pequeñas, orgánicas o inorgánicas, que requiere el apoenzima para su actividad. Por ejemplo, en la lisina oxidasa, el cobre está unido débilmente, pero es necesario para que el enzima sea activo. El grupo prostético es similar al cofactor, pero está firmemente unido al apoenzima. Por ejemplo, en los citocromos, el grupo prostético hemo está unido muy fuertemente y se requieren ácidos fuertes para disociarlo del apocitocromo. La adición de cofactores o grupos prostéticos a la apoproteína da lugar al **holoenzima**, que es el enzima activo. La molécula sobre la que actúa el enzima para formar un producto se denomina **sustrato**. Dado que muchas reacciones son reversibles, los productos de la reacción directa son los sustratos de la reacción inversa.

Los enzimas presentan una alta especificidad. Por ejemplo, la glucosa oxidasa oxida glucosa, pero no galactosa. Esta especificidad reside en una región determinada de la superficie enzimática, el **centro de fijación del sustrato**, que es un ordenamiento determinado de las cadenas laterales de aminoácidos del polipéptido dispuesto especialmente para fijar un sustrato específico. Algunos enzimas tienen una especificidad amplia; la hexoquinasa fosforila glucosa, manosa y fructosa, mientras que la glucoquinasa es específica para glucosa. El centro de fijación del sustrato

puede estar integrado dentro del centro activo. En algunos casos, sin embargo, puede darse que el centro activo no esté dentro del centro de fijación del sustrato, sino que sea contiguo a éste en la secuencia primaria. En otros casos, el centro activo se sitúa en regiones distantes de la secuencia primaria, si bien, debido al plegamiento de la estructura terciaria, se coloca adyacentemente al centro de fijación del sustrato. El **centro activo** contiene, en forma de determinadas cadenas laterales de aminoácidos, la maquinaria destinada a catalizar la reacción.

Algunos enzimas tienen variantes denominadas **isoenzimas** (**isozimas**) que catalizan la misma reacción química. Los isoenzimas se distinguen electroforéticamente debido a que presentan mutaciones que afectan a uno o más aminoácidos de regiones no críticas de la proteína.

En algunos enzimas existe otra región de la molécula, el centro **alostérico**, que no se encuentra en el centro activo ni en el centro de fijación del sustrato, sino que es un sitio único al que se unen moléculas pequeñas que dan lugar a un cambio en el centro de fijación del sustrato o en la actividad que se produce en el centro activo. La fijación de una molécula pequeña y específica en el centro alostérico provoca un cambio en la conformación del enzima. Este cambio conformacional puede hacer que el centro activo sea más o menos activo aumentando o disminuyendo la afinidad del sitio de fijación por el sustrato. Estas interacciones regulan la actividad de los enzimas, y se tratan con más detalle en la p. 436.

10.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS

La International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ha establecido un sistema por el que todos los enzimas se incluyen en seis clases principales. Cada clase se divide en varias subclases que, a su vez, tienen otras subdivisiones. Para designar un enzima se indican primero los sustratos y después el tipo de reacción, al cual se le añade el sufijo -asa. Por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa es la alcohol:NAD^+ oxidorreductasa porque cataliza una reacción de oxidación–reducción y el dador de electrones es un alcohol y el aceptor es el NAD^+. Persisten muchos nombres comunes, si bien no son demasiado informativos. Por ejemplo, "aldolasa" no dice demasiado acerca de los sustratos, aunque identifica el tipo de reacción. En este capítulo utilizaremos los nombres simplificados aceptados por la IUBMB y que son de uso habitual. La Tabla 10.1 resume las seis clases principales de enzimas y sus subclases.

TABLA 10.1 Resumen de las Clases enzimáticas y de las principales Subclases

1. Oxidorreductasas	2. Transferasas
Deshidrogenasas	Transaldolasa y transcetolasa
Oxidasas	Acil-, metil-, glucosil- y fosforiltransferasas
Reductasas	Quinasas
Peroxidasas	Fosfomutasas
Catalasa	
Oxigenasas	
Hidroxilasas	
3. Hidrolasas	4. Liasas
Esterasas	Descarboxilasas
Glucosidasas	Aldolasas
Peptidasas	Hidratasas
Fosfatasas	Deshidratasas
Tiolasas	Sintasas
Fosfolipasas	Liasas
Amidasas	
Desaminasas	
Ribonucleasas	
5. Isomerasas	6. Ligasas
Racemasas	Sintetasas
Epimerasas	Carboxilasas
Isomerasas	
Mutasas (no todas)	

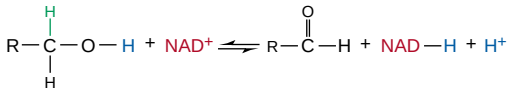
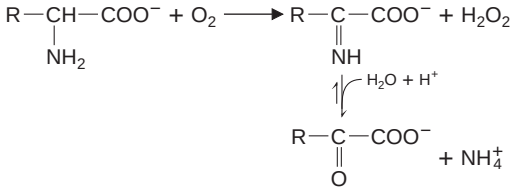


FIGURA 10.1
Oxidación del etanol por la alcohol deshidrogenasa.

Clase 1: Oxidorreductasas

Estos enzimas catalizan reacciones de oxidación–reducción. Por ejemplo, la alcohol:NAD^+ oxidorreductasa (una **deshidrogenasa**, específicamente la alcohol deshidrogenasa) cataliza la oxidación de un alcohol a aldehído. Este enzima elimina dos electrones y dos átomos de hidrógeno del alcohol para producir un aldehído; durante el proceso, los dos electrones que originariamente estaban en el enlace carbono–hidrógeno del alcohol se transfieren al NAD^+, el cual queda reducido (Figura 10.1). El NAD^+, cuya estructura se presenta en la Figura 10.18, es un cofactor que interviene en muchas reacciones de oxidación–reducción biológicas. En la Figura 10.19, se muestra el sitio redox del NAD^+. Además de actuar sobre grupos funcionales alcohol y aldehído, las deshidrogenasas también actúan sobre los siguientes grupos funcionales como dadores de electrones: $—CH_2—CH_2—$, $—CH_2—NH_2$ y $—CH{=}NH$, así como los coenzimas NADH, NADPH, FADH y FMNH (véase p. 426).

Existen otras subclases de oxidorreductasas. Las **oxidasas** transfieren dos electrones desde el dador al oxígeno y se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Normalmente el flujo de electrones desde el sustrato al producto se hace a través de coenzimas de flavina o metales. Por ejemplo, la D-aminoácido oxidasa cataliza la reacción global siguiente



En la Figura 10.2 se muestra esquemáticamente la oxidación inicial del aminoácido por el FAD y la siguiente reoxidación del $FADH_2$ por el oxígeno. La **citocromo oxidasa** es algo especial en el sentido que produce H_2O en lugar de H_2O_2 en la reducción del oxígeno. Las **oxigenasas** catalizan la incorporación de oxígeno a un sustrato. Con las **dioxigenasas**, los dos átomos del O_2 se incorporan a un producto

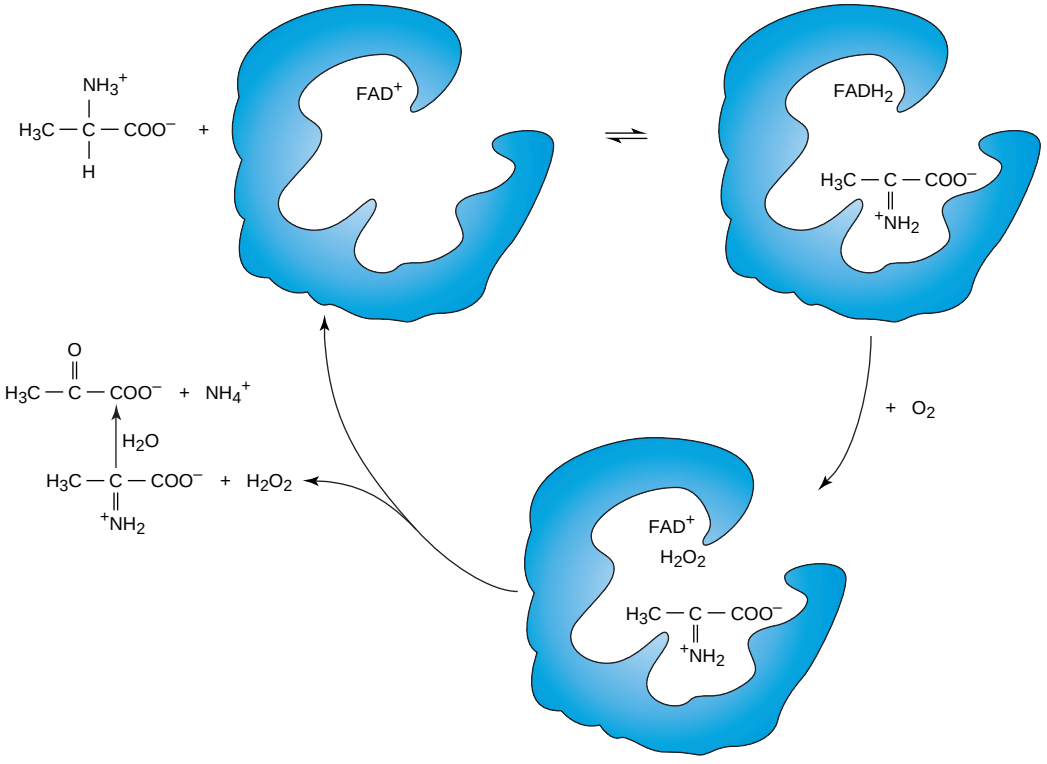


FIGURA 10.2
Oxidación de la alanina por la D-aminoácido oxidasa.

único, mientras que las **monooxigenasas** incorporan un único átomo de oxígeno en forma de grupo hidroxilo, al tiempo que el otro oxígeno se reduce a agua con electrones del sustrato o de un segundo sustrato que no se oxigena. La catecol oxigenasa cataliza la reacción de dioxigenación (Figura 10.3); la esteroide hidroxilasa es ilustrativa de una reacción del tipo monooxigenasa (oxigenasa de función mixta) en la que un átomo de oxígeno se incorpora al agua y el otro al esteroide (Figura 10.4). Las **peroxidasas** utilizan H_2O_2 en lugar del oxígeno como oxidante. La NADH peroxidasa cataliza la reacción

$$NADH + H^+ + H_2O_2 \rightleftharpoons NAD^+ + 2H_2O$$

La **catalasa** es única en el sentido de que el H_2O_2 sirve tanto de dador como de aceptor. La función de la catalasa en la célula es la de destoxificar el H_2O_2:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2H_2O$$

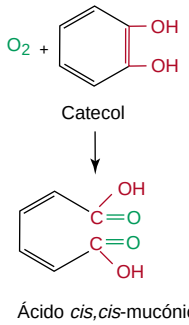
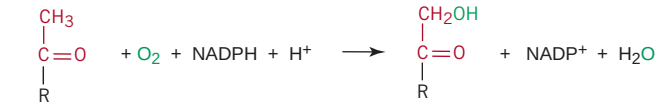


FIGURA 10.3
Oxigenación del catecol por una oxigenasa.



Progesterona **Desoxicorticosterona**

FIGURA 10.4
Hidroxilación de la progesterona por una monooxigenasa.

Clase 2: Transferasas

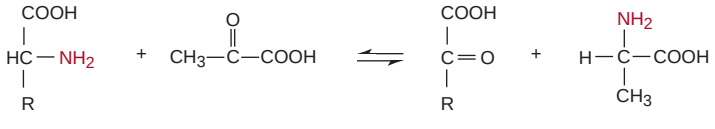
Estos enzimas transfieren grupos funcionales entre dadores y aceptores. Las principales porciones transferidas son los grupos amino, acilo, fosfato, glucosilo y los grupos monocarbonados. Las **aminotransferasas (transaminasas)** transfieren un grupo amino de un aminoácido a un α-cetoácido aceptor; el resultado es la formación de un nuevo aminoácido y un nuevo cetoácido (Figura 10.5).

Las **quinasas** son los enzimas que catalizan la transferencia del grupo γ fosforilo, químicamente lábil, desde el ATP u otro nucleósido trifosfato a grupos aceptores alcohol o amino. Estos aceptores pueden ser moléculas orgánicas pequeñas tal como la glucosa o macromolécules tales como proteínas. Por ejemplo, la proteína quinasa A transfiere fosfato desde el ATP al hidroxilo de serinas de enzimas específicos. La forma fosforilada de la proteína puede ser más o menos activa que la especie no fosforilada, según el caso.

En general, el grupo que ha de ser transferido debe estar en forma activada, es decir, se ha de hacer químicamente lábil para que pueda tener lugar la transferencia. Esto se consigue frecuentemente formando un éster con el ATP de la forma siguiente:

$$ATP + R{-}OH \rightleftharpoons R{-}O{-}ADP + P_i$$

El grupo "R" puede ahora ser transferido a un aceptor para formar un nuevo compuesto.

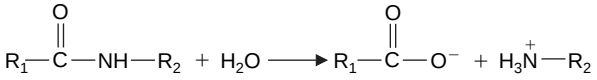


(aminoácido$_1$) **(cetoácido$_2$)** **(cetoácido$_1$)** **(aminoácido$_2$)**

FIGURA 10.5
Ejemplo de reacción catalizada por una aminotransferasa.

Clase 3: Hidrolasas

Este grupo de enzimas se puede considerar como una clase especial de transferasas en las que el grupo dador se transfiere al agua. La reacción generalizada implica la rotura hidrolítica de enlaces C—O, C—N, O—P y C—S. La rotura del enlace peptídico es un buen ejemplo de esta reacción:



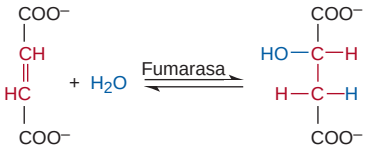


FIGURA 10.7
Reacción de la fumarasa.

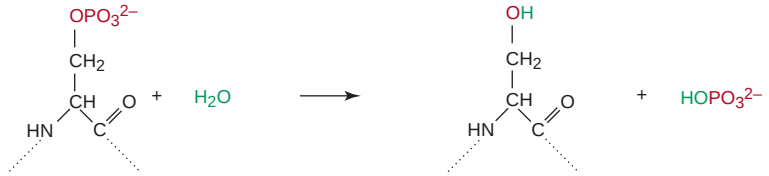
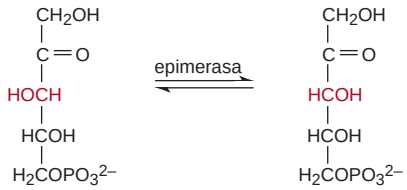


FIGURA 10.6
Hidrólisis de una proteína fosforilada por una fosfatasa.



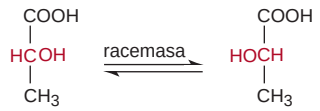


FIGURA 10.8
Ejemplos de reacciones catalizadas por una epimerasa y una racemasa.

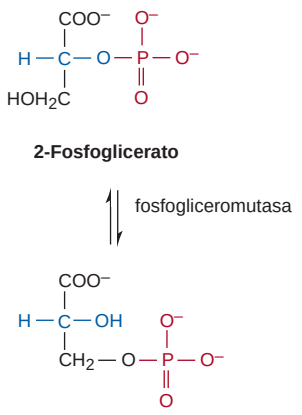


FIGURA 10.9
Interconversión del 2- y 3-fosfoglicerato.

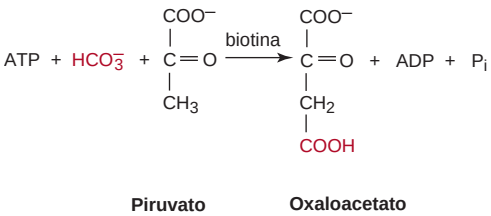


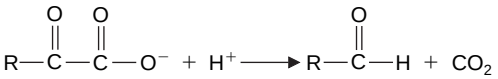
FIGURA 10.10
Reacción de la piruvato carboxilasa.

Los enzimas proteolíticos constituyen una clase especial de hidrolasas denominadas peptidasas.

Las **fosfatasas** son enzimas que reemplazan un grupo fosfato por un grupo hidroxilo del agua (Figura 10.6). En el caso de las proteína fosfatasas su acción es la de revertir los efectos de las proteína quinasas.

Clase 4: Liasas

Las **liasas** son enzimas que añaden o eliminan los elementos del agua, amoníaco o dióxido de carbono. Las **descarboxilasas** eliminan unidades de CO_2 de α- y β-cetoácidos o aminoácidos:



Las **deshidratasas** eliminan H_2O en una reacción de deshidratación. La fumarasa convierte el fumarato en malato (Figura 10.7).

Clase 5: Isomerasas

Este es un grupo muy heterogéneo de enzimas que catalizan isomerizaciones de diversos tipos. Entre ellas se encuentran interconversiones cis—trans y aldosa—cetosa. Las **isomerasas** que catalizan la inversión en átomos de carbono asimétricos son epimerasas o racemasas (Figura 10.8). Las **mutasas** catalizan la transferencia intramolecular de un grupo tal como el fosforilo. La transferencia puede ser directa pero puede implicar un enzima fosforilado como intermedio. La fosfoglicerato mutasa cataliza la conversión del 2-fosfoglicerato en 3-fosfoclicerato (Figura 10.9).

Clase 6: Ligasas

Dado que ligar significa unir, estos enzimas participan en reacciones sintéticas en las que se unen dos moléculas a expensas de un "enlace fosfato de alta energía" del ATP. El término **sintetasa** se reserva para este grupo particular de enzimas. La formación de los aminoacil-tRNA, acil coenzima A, glutamina y la adición de CO_2 al piruvato son reacciones catalizadas por ligasas. La piruvato carboxilasa es un buen ejemplo de una ligasa (Figura 10.10). Los dos sustratos, bicarbonato y piruvato, se ligan formando un α-cetoácido de cuatro carbonos (C4).

10.3 | CINÉTICA

La cinética estudia la velocidad de transformación de los reactivos en productos

Dado que los enzimas modifican la velocidad de reacciones químicas, es importante conocer la cinética química básica y la manera de aplicar los principios cinéticos a las reacciones catalizadas por enzimas. La **cinética** es el estudio de la velocidad de cambio de reactivos a productos. La **velocidad** se expresa en términos del cambio en la concentración de sustrato o producto por unidad de tiempo, mientras que la **tasa** se refiere a cambios en la cantidad total (moles o gramos) por unidad de tiempo. Los bioquímicos tienden a utilizar los dos términos indistintamente.

La velocidad de una reacción A → P se determina a partir de su curva de progreso o perfil de velocidad. La curva de progreso se puede determinar siguiendo la desaparición de los reactivos o la aparición de producto a distintos tiempos. En la Figura 10.11 se representa la aparición de producto respecto al tiempo. La pendiente de las tangentes a la curva de progreso proporciona la velocidad instantánea en aquel momento. La **velocidad inicial** es el cambio en la concentración de reactivo o de producto durante los primeros segundos de la reacción y se determina como la pendiente de la línea durante la fase lineal de la reacción, extrapolada a tiempo cero (Figura 10.11). Nótese que la velocidad cambia constantemente a medida que la reacción se aproxima al equilibrio, y en el equilibrio es cero. Matemáticamente, la velocidad se expresa como

$$\text{Velocidad} = \boldsymbol{v} = -\frac{d[\text{A}]}{dt} = \frac{d[\text{P}]}{dt} \qquad \textbf{(10.1)}$$

que representa el cambio en la concentración de los reactivos o productos por unidad de tiempo.

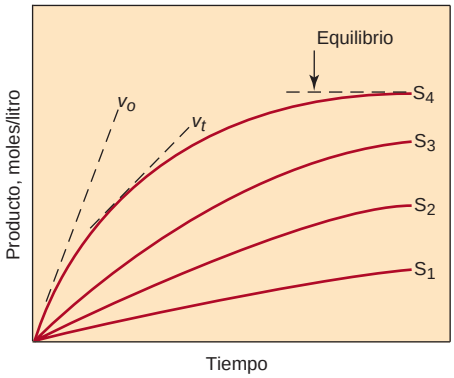


FIGURA 10.11
Curvas de progreso de una reacción catalizada enzimáticamente.
La velocidad inicial (v_0) de la reacción se determina a partir de la pendiente de la curva de progreso en el inicio de la reacción. La velocidad inicial aumenta con concentraciones de sustrato crecientes (S_1 a S_4), pero alcanza un valor límite que es característico de cada enzima. La velocidad en cualquier instante t, se simboliza v_t.

La ecuación de velocidad

La determinación de la velocidad de una reacción no revela nada acerca de la estequiometría de los reactivos y los productos, ni sobre el mecanismo de la reacción. Lo que se necesita es una ecuación que relacione la velocidad inicial determinada experimentalmente con la concentración de los reactivos. Esta relación es la ecuación de velocidad. En el caso de la reacción A → P, la ecuación de velocidad es

$$\frac{-d[\text{A}]}{dt} = \boldsymbol{v} = k[\text{A}]^n \qquad \textbf{(10.2)}$$

Es decir, la velocidad inicial observada depende de la concentración inicial de A elevada a la potencia n multiplicada por una constante de proporcionalidad (k). Esta última se conoce como **constante de velocidad**. Normalmente, el exponente n es un entero entre 1 y 3 requerido para satisfacer la identidad matemática de la expresión de la velocidad.

Caracterización de las reacciones según el orden

Otro término útil en la descripción de una reacción es el **orden de la reacción**. El orden se determina empíricamente como la suma de los exponentes de cada término de concentración en la expresión de la velocidad. En el caso que estamos tratando, la reacción es de **primer orden**, ya que la velocidad depende de la concentración de A elevada a la primera potencia, $v = k[\text{A}]^1$. En una reacción tal como A + B → C, si el orden con respecto a A y B es 1, es decir, $v = k[\text{A}]^1[\text{B}]^1$, globalmente la reacción es de segundo orden. Debe tenerse en cuenta que el orden de la reacción es independiente de la estequiometría de la reacción; esto es, si la reacción fuese de tercer orden, la expresión de velocidad podría ser $v = k[\text{A}][\text{B}]^2$ o $v = k[\text{A}]^2[\text{B}]$, según fuese el orden con respecto a A y B.

Dado que la velocidad de la reacción cambia constantemente a medida que cambia la concentración de los reactivos, las condiciones de reacción de primer orden no son ideales para ensayar una reacción catalizada por un enzima ya que habrá dos variables, la concentración variable de sustrato y la concentración desconocida de enzima.

Si se integra la expresión diferencial de primer orden (10.2), se obtiene

$$k_1 \cdot t = 2{,}3 \log\left(\frac{[\text{A}]}{[\text{A}] - [\text{P}]}\right) \qquad \textbf{(10.3)}$$

en la que [A] es la concentración inicial de reactivo y [P] es la concentración del producto formado en el tiempo t. La unidad de la constante de velocidad de primer orden, k_1, es la inversa del tiempo. Si se vuelven a representar los datos mostrados en la Figura 10.11 en forma de log [P] frente al tiempo para cualquier concentración de sustrato, se obtiene una línea recta con pendiente igual a $k_1/2{,}303$. La constante de velocidad k_1 no debe confundirse con la velocidad de la reacción.

Muchos procesos biológicos tienen lugar en condiciones de primer orden. La eliminación de muchos fármacos de la sangre por parte de los tejidos periféricos es

un proceso de primer orden. En estos casos se puede utilizar una forma especializada de la ecuación de velocidad. Si definimos $t_{1/2}$ como el tiempo necesario para que la concentración de los reactivos o el nivel de un fármaco en la sangre se reduzca a la mitad de su valor inicial, la Ec. (10.3) se transforma entonces en

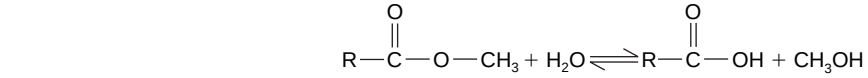
$$k_1 \cdot t_{1/2} = 2{,}3 \log \left(\frac{1}{1 - \frac{1}{2}} \right) = 2{,}3 \log 2 = 0{,}69 \qquad \textbf{(10.4)}$$

o sea

$$t_{1/2} = \frac{0{,}69}{k_1} \qquad \textbf{(10.5)}$$

Nótese que $t_{1/2}$ no es la mitad del tiempo requerido para que se complete la reacción. El término $t_{1/2}$ se conoce como **vida media** de la reacción.

Muchas reacciones de segundo orden en las que interviene el agua o cualquier otro reactivo en gran exceso pueden ser tratadas como reacciones de pseudo-primer orden. En la hidrólisis de un éster,



la expresión de velocidad de segundo orden es

$$\text{velocidad} = v = k_2[\text{éster}]^1[H_2O]^1 \qquad \textbf{(10.6)}$$

pero, ya que el agua es muy abundante (55,5 M) en comparación con el éster (10^{-2}–10^{-3} M), el sistema obedece la ley de velocidad de primer orden [ec. (10.2)], y parece que la reacción transcurre como si fuera una reacción de primer orden. Las reacciones celulares que suponen hidratación, deshidratación o hidrólisis son de pseudo-primer orden.

La expresión de velocidad para la reacción de **orden cero** es $v = k_0$. Obsérvese que no existe ningún término de concentración para los reactivos; por tanto, la adición de más reactivo no aumenta la velocidad. La desaparición de reactivo o la aparición de producto tiene lugar a una velocidad constante independiente de la concentración de reactivo. Las unidades de la constante de velocidad son concentración por unidad de tiempo. Las condiciones de reacción de orden cero sólo tienen lugar en reacciones catalizadas cuando la concentración de los reactivos es lo suficientemente elevada para saturar todos los centros catalíticos. En estas condiciones, el catalizador está operando a máxima velocidad, y todos los centros catalíticos están ocupados; por tanto, la adición de más reactivo no puede incrementar la velocidad.

Reversibilidad de las reacciones

Aunque la mayoría de las reacciones químicas son reversibles, se impone una cierta direccionalidad en etapas concretas de rutas metabólicas mediante la eliminación rápida del producto final por reacciones posteriores de la ruta. Muchas reacciones de ligasas que utilizan nucleósido trifosfatos dan lugar a la liberación de pirofosfato (PP_i). Estas reacciones se hacen irreversibles por la hidrólisis del pirofosfato en 2 moles de fosfato inorgánico, P_i. Esquemáticamente

$$A + B + ATP \rightarrow A{-}B + AMP + PP_i$$
$$PP_i + H_2O \rightarrow 2P_i$$

La conversión del pirofosfato de "alta energía" en fosfato inorgánico impone la irreversibilidad en el sistema debido a la estabilidad termodinámica de los productos.

En las reacciones que son reversibles, la constante de equilibrio de la reacción

$$A + B \rightarrow C$$

es

$$K_{eq} = \frac{[C]}{[A][B]} \qquad \textbf{(10.7)}$$

que también puede expresarse en términos de constantes de velocidad de las reacciones directa e inversa:

$$A + B \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C$$

en la que

$$\frac{k_1}{k_2} = K_{eq} \qquad \textbf{(10.8)}$$

La Ec. (10.8) muestra la relación entre cantidades cinéticas y termodinámicas. La K_{eq} es una expresión termodinámica del estado del sistema, mientras que k_1 y k_2 son expresiones cinéticas relacionadas con la velocidad a la cual se llega a tal estado.

Los enzimas presentan cinética de saturación

Terminología

La actividad enzimática se expresa habitualmente en micromoles (μmol) de sustrato convertidos en producto por minuto, en determinadas condiciones de ensayo especificadas. Una unidad estándar de actividad enzimática (U) es aquella actividad que cataliza la transformación de 1 μmol min^{-1} de sustrato. La **actividad específica** de una preparación enzimática se define como el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (μmol min^{-1} mg proteína^{-1} o U/mg de proteína). Sin embargo, esta expresión no indica si en la muestra analizada la única proteína presente es el enzima; durante la purificación de los enzimas, este valor va aumentando a medida que se van eliminando las proteínas contaminantes. La constante catalítica, o **número de recambio** (*turnover*), para un enzima es igual a las unidades de actividad enzimática por mol de enzima (μmol min^{-1} mol de enzima^{-1}). En aquellos casos en los que hay más de un centro catalítico, la constante catalítica se refiere, a menudo, a la masa molecular de la subunidad y no a la masa molecular de la proteína completa.

La constante catalítica o número de recambio permite una comparación directa de la capacidad catalítica relativa entre enzimas. Por ejemplo, las constantes de la catalasa y de la α-amilasa son 5×10^6 y $1{,}9 \times 10^4$, respectivamente, lo que indica que la catalasa es aproximadamente 250 veces más activa que la amilasa. La **velocidad máxima**, $\mathbf{V_{máx}}$, es la velocidad obtenida en condiciones de saturación del enzima por sustrato en unas condiciones determinadas de pH, temperatura y fuerza iónica. La $V_{máx}$ es constante para una concentración determinada de enzima.

Interacción de enzima y sustrato

La velocidad inicial de una reacción catalizada por un enzima depende de la concentración de sustrato (S) (Figura 10.11). A medida que aumenta la concentración de sustrato (S_1–S_4), la velocidad inicial aumenta hasta que el enzima está completamente saturado por el sustrato. Si se representan las velocidades iniciales obtenidas a varias concentraciones de sustrato, se obtiene una hipérbola rectangular (Figura 10.12) igual a la curva que se obtiene en la fijación de oxígeno a la mioglobina como función de la presión de oxígeno. En general, se obtiene una hipérbola rectangular en cualquier proceso que suponga una interacción o fijación de reactivos u otras sustancias a un número específico, pero limitado, de centros. La velocidad de la reacción alcanza un límite máximo en el punto en que todos los centros asequibles están saturados. La curva de la Figura 10.12 se denomina curva de saturación por sustrato de una reacción catalizada enzimáticamente, y refleja el hecho de

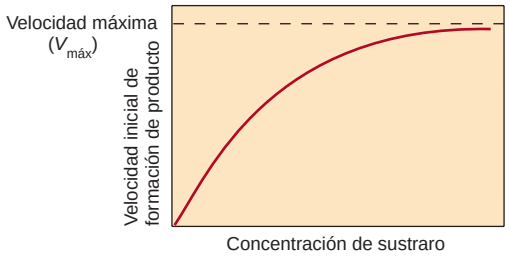


FIGURA 10.12
Gráfica de la velocidad frente a la concentración de sustrato en una reacción catalizada por un enzima.
Las velocidades iniciales se representan frente a la concentración de sustrato a la que se han determinado. La curva es una hipérbola rectangular que se aproxima asintóticamente a la máxima velocidad posible con una cantidad determinada de enzima.

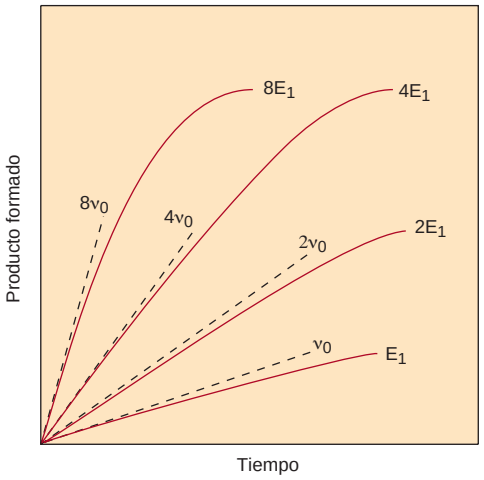


FIGURA 10.13
Curvas de progreso a concentraciones variables de enzima y niveles saturantes de sustrato.
La velocidad inicial (v_0) se duplica cuando la concentración de enzima se duplica. Como todas las concentraciones de sustrato son iguales, las concentraciones finales de producto en el equilibrio serán idénticas en todos los casos; sin embargo, el equilibrio se obtendrá más lentamente en aquellos ensayos que contengan cantidades menores de enzima.

que el enzima tiene un centro específico de fijación del sustrato. El enzima (E) y el sustrato han de interaccionar de alguna forma para que el sustrato pueda ser convertido en productos. Inicialmente, se forma un complejo entre el enzima y el sustrato:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad \textbf{(10.9)}$$

La **constante de velocidad** para la formación de este complejo ES se define como k_1 y la constante de velocidad para la disociación del complejo ES se define como k_2. Hasta ahora hemos descrito solamente un equilibrio de fijación de enzima y sustrato. El proceso químico en el que se forman o rompen enlaces tiene lugar en el complejo ES. Se da entonces la conversión de sustrato a productos (P) a partir del complejo ES con una constante de velocidad k_3. Por tanto, la Ec. (10.9) se transforma en

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad \textbf{(10.10)}$$

La Ec. (10.10) es una formulación general del mecanismo de la acción enzimática. El equilibrio entre E y S se puede expresar como una constante de afinidad, K_a, solamente si la velocidad de la fase química de la reacción, k_3, es pequeña comparada con k_2; entonces, $K_a = k_1/k_2$. Anteriormente utilizamos K_{eq} para describir reacciones químicas. En enzimología, se prefiere la constante de asociación o de afinidad K_a.

La **velocidad inicial**, v_0, de una reacción catalizada por un enzima depende de la cantidad de sustrato presente y de la concentración de enzima. La Figura 10.13 muestra curvas de progreso para concentraciones crecientes de enzima, en las que inicialmente existe suficiente cantidad de sustrato para saturar el enzima a todos los niveles. La velocidad inicial se duplica a medida que se duplica la concentración de enzima. A concentraciones más bajas de enzima, el equilibrio se obtiene más lentamente que a concentraciones elevadas, pero la posición del equilibrio final es siempre la misma.

De lo anteriormente expuesto podemos concluir que la velocidad de una reacción enzimática depende tanto de la concentración de sustrato como de la de enzima.

Formulación de la ecuación de Michaelis–Menten

En la discusión de la cinética química se desarrollaron ecuaciones de velocidad en las que la velocidad de la reacción podía expresarse en función de la concentración de sustrato. Este enfoque es también válido para las reacciones catalizadas enzimáticamente, en donde el objetivo final es obtener una relación que permita correlacionar la velocidad de una reacción con la cantidad de enzima. En primer lugar debe desarrollarse una ecuación de velocidad que relacione la velocidad de la reacción con la concentración de sustrato.

En el desarrollo de esta ecuación, conocida como ecuación de **Michaelis–Menten**, se requieren tres supuestos básicos dada la Ec. (10.10). El primero es que el complejo ES está en **estado estacionario**. Es decir, durante las fases iniciales de la reacción, la concentración del complejo ES permanece constante, aun cuando muchas moléculas de sustrato se convierten en productos vía complejo ES. El segundo supuesto es que, en condiciones de saturación, todo el enzima se convierte en complejo ES y no queda nada libre. Esto se produce cuando la concentración de sustrato es elevada. El tercer supuesto es que si todo el enzima se encuentra en forma de complejo ES, la velocidad de formación de productos es la máxima posible, esto es,

$$V_{máx} = k_3[ES] \qquad \textbf{(10.11)}$$

Si escribimos la expresión del estado estacionario de formación y rotura del complejo ES como

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \qquad \textbf{(10.12)}$$

entonces la expresión de la velocidad puede obtenerse tras una transformación algebraica adecuada

$$\text{velocidad} = v_0 = \frac{V_{máx} \cdot [S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{(10.13)}$$

en donde v_0 es la velocidad inicial a una concentración de sustrato [S]. La Ec. (10.13) es la ecuación de Michaelis-Menten. Es la ecuación fundamental de la enzimología que relaciona la velocidad inicial de una reacción catalizada por un enzima con la concentración de sustrato. Las dos constantes de esta ecuación de velocidad, $V_{máx}$ y K_m son únicas para cada enzima en condiciones específicas de pH y temperatura a una concentración dada de enzima. Para aquellos enzimas en los que $k_3 \ll k_2$, K_m se transforma en el recíproco de la constante de fijación de enzima–sustrato, y la $V_{máx}$ refleja la fase catalítica del mecanismo enzimático tal como sugiere la Ec. (10.11). Así, en este modelo, la actividad del enzima se puede separar en dos fases: fijación del sustrato, seguida de modificación química del mismo. Esta naturaleza bifásica del mecanismo enzimático se demuestra en el ejemplo tratado en la Apli. Clín. 10.1.

Significado de la K_m

Pudiera creerse que el concepto de K_m carece de importancia fisiológica o clínica. Nada más alejado de la realidad. Como se verá en la Sección 10.9 (p. 453), todos los ensayos enzimáticos válidos que se llevan a cabo en los laboratorios clínicos se basan en el conocimiento del valor de la K_m para cada sustrato. En el control fisiológico del metabolismo de la glucosa y del fosfato intervienen dos hexoquinasas, una de elevada K_m para glucosa y otra de baja K_m. Ambas contribuyen al mantenimiento de los niveles estacionarios de glucosa y fosfato de la sangre, tal como se discutirá en la p. 615.

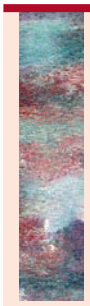
En general, los valores de K_m son cercanos a las concentraciones de sustrato que se dan en la célula, quizás porque los enzimas han desarrollado centros de unión de sustrato con una afinidad comparable a la de los niveles presentes *in vivo*. De vez en cuando se produce una mutación en un centro de unión del enzima, o se expresa un isoenzima con una K_m alterada. Ambos fenómenos pueden tener como resultado un comportamiento fisiológico anormal. A este respecto, es ilustrativo el caso de personas de origen asiático, en las que sólo se expresa la forma atípica de la aldehído deshidrogenasa (Apli. Clín. 10.2).

Obsérvese que si hacemos que la velocidad inicial, v_0, sea igual a $\frac{1}{2}\ V_{máx}$ en la Ec. (10.13), K_m se hace igual a [S]:

$$\tfrac{1}{2}V_{máx} = \frac{V_{máx} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m + [S] = \frac{2V_{máx} \cdot [S]}{V_{máx}}$$

$$K_m = [S]$$

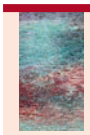


APLICACIÓN CLÍNICA 10.1

Un caso de gota demuestra la existencia de dos fases en el mecanismo de acción enzimático

Las dos fases del modelo de Michaelis–Menten de la acción enzimática, fijación seguida por modificación del sustrato, se ilustran mediante estudios sobre una familia aquejada de gota. El paciente excretaba tres veces más la cantidad normal de ácido úrico por día y tenía niveles significativamente mayores de 5′-fosforribosil-α-pirofosfato (PRPP) en sus hematíes. El PRPP es un intermedio de la biosíntesis de AMP y GMP, que son convertidos en ATP y GTP. El ácido úrico procede directamente de la degradación del AMP y GTP. Los ensayos *in vitro* revelaron que la actividad PRPP sintetasa eritrocitaria del paciente estaba aumentada tres veces. El pH óptimo y la K_m del enzima para el ATP y la ribosa 5-fosfato eran normales, pero la $V_{máx}$ era tres veces mayor. Este aumento no se debía a la mayor cantidad de enzima; pruebas inmunológicas con un anticuerpo específico para el enzima revelaron la existencia de niveles de la proteína semejantes a los de eritrocitos normales. Este hallazgo demuestra que la fijación del sustrato reflejada por su K_m y la posterior acción química sobre la catálisis, que se revela en la $V_{máx}$, son fases separadas del proceso catalítico global. Esta situación es válida solamente para aquellos mecanismos enzimáticos en los que $k_3 \gg k_2$.

Becker, M. A., Kostel, P. J., Meyer, L. J. y Seegmiller, J. E. Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase: increased enzyme specific activity in a family with gout and excessive purine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2749, 1973.



APLICACIÓN CLÍNICA 10.2

Efecto fisiológico de las variaciones en el valor de la K_m de un enzima

La inusual sensibilidad de los orientales a las bebidas alcohólicas tiene una base bioquímica. La cantidad de etanol que se necesita para provocar la vasodilatación responsable de la taquicardia y enrojecimiento facial es muy inferior para algunos chinos y japoneses que para los europeos. Los efectos fisiológicos son provocados por el acetaldehído liberado por la alcohol deshidrogenasa hepática.

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + H^+ + NADH$$

El acetaldehído es normalmente eliminado por una aldehído deshidrogenasa mitocondrial que lo convierte en acetato. En algunos asiáticos, la forma normal de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial, con una K_m para acetaldehído baja, está ausente. Estos individuos poseen únicamente la forma citosólica de K_m alta (menor afinidad) del enzima, la cual conlleva un nivel estacionario elevado de acetaldehído en la sangre tras el consumo de alcohol. Esta es la causa del incremento de sensibilidad al alcohol.

Crabb, D. W., Edenberg, H. J., Bosron, W. F. y Li, T.-K. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity: The ALDH2(2) allele is dominant. *J. Clin. Invest.* 83:314, 1989.

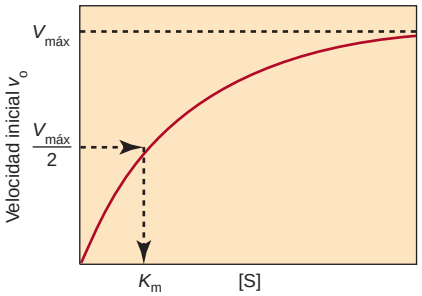


FIGURA 10.14
Determinación gráfica de K_m a partir de la gráfica de v_0 frente a [S].
La K_m es la concentración de sustrato a la que el enzima presenta la mitad de la velocidad máxima.

Por tanto, a partir de una curva de saturación de sustrato puede deducirse el valor numérico de la K_m mediante análisis gráfico (Figura 10.14). Dicho de otro modo, la K_m es igual a la concentración de sustrato cuando la velocidad es la mitad de la velocidad máxima.

Forma lineal de la ecuación de Michaelis–Menten

En la práctica la determinación de K_m a partir de la curva de saturación de sustrato no es muy precisa, debido a que la aproximación a $V_{máx}$ se hace asintóticamente. Si se toma el recíproco de la Ec. (10.13) y se separan las variables en una forma consistente con la ecuación de una línea recta ($y = mx + b$), entonces

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{máx}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Una gráfica del inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración inicial de sustrato da una línea cuya pendiente es $K_m/V_{máx}$ y cuya intersección en el eje y es $1/V_{máx}$. En la Figura 10.15 se muestra una gráfica de este tipo. Frecuentemente, es más fácil obtener K_m a partir de la intersección sobre el eje x, que es $-1/K_m$.

Esta forma lineal de la ecuación de Michaelis–Menten se conoce como gráfica de **Lineweaver– Burk** o de los **dobles recíprocos**. Su ventaja es que se pueden obtener valores estadísticamente significativos de K_m y de $V_{máx}$ directamente a partir de seis a ocho puntos experimentales.

Un mismo enzima cataliza las direcciones directa e inversa de una reacción reversible

Como se ha indicado previamente, los enzimas no alteran la constante de equilibrio de una reacción; en consecuencia, en la reacción

$$S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P$$

la dirección de flujo del material, bien en el sentido directo bien en el sentido inverso, dependerá de la concentración de S relativa a P y de la constante de equilibrio de la reacción. Dado que los enzimas catalizan tanto la reacción directa como la inversa, puede aparecer un problema si el producto tiene una afinidad por el enzima similar a la del sustrato. En este caso, el producto puede volverse a fijar fácilmente al centro activo del enzima y competir con el sustrato por dicho centro. En tales casos, el producto inhibe la reacción a medida que aumenta la concentración del producto. La gráfica de Lineweaver–Burk no será lineal en aquellos casos en los que el enzima sea susceptible de **inhibición por producto**. Si el siguiente enzima en la ruta metabólica elimina el producto rápidamente, entonces no tiene lugar la inhibición por producto.

En una ruta metabólica, la inhibición por producto proporciona un medio limitado de control o de regulación del flujo de sustrato a través de la ruta. A medida que el producto final de la ruta aumenta, aumenta también cada intermedio por la acción de masas. Si uno o más enzimas de la ruta son especialmente sensibles a la inhibición por producto, se suprimirá la fabricación del producto final de la ruta. La reversibilidad de una ruta o de una reacción enzimática concreta depende de la velocidad de eliminación del producto. Si el producto final se elimina fácilmente, entonces la ruta puede ser fisiológicamente unidireccional.

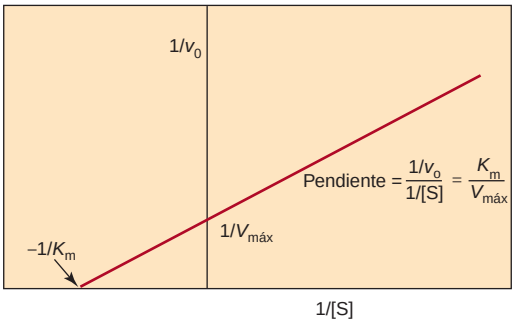


FIGURA 10.15
Determinación de K_m y $V_{máx}$ mediante la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk.
Las gráficas del recíproco de la velocidad inicial frente al recíproco de la concentración de sustrato utilizada para determinar la velocidad inicial dan una línea recta cuya intersección en x es $-1/K_m$.

Las reacciones multisustrato siguen un mecanismo ping–pong o bien un mecanismo secuencial

La mayoría de los enzimas utilizan más de un sustrato, o actúan sobre un sustrato con un coenzima y generan uno o más productos. En cualquier caso, cuando se realiza un ensayo enzimático, debe determinarse una K_m para cada sustrato y coenzima implicados en la reacción.

Mecanísticamente, las reacciones enzimáticas se dividen en dos categorías principales: ping–pong y secuenciales. Existen muchas variaciones de estos mecanismos principales. El **mecanismo ping–pong** se puede representar como sigue:

$$E + A \longrightarrow EA \longrightarrow E' \longrightarrow E'B \longrightarrow P_2 + E$$

(P_1 sale en el paso $EA \rightarrow E'$; B entra en el paso $E' \rightarrow E'B$)

donde el sustrato A reacciona con E para formar el producto P_1, el cual se libera antes de que el segundo sustrato B se fije al enzima modificado E′. Entonces B se convierte en el producto P_2 y se regenera el enzima. Un buen ejemplo de este mecanismo es la reacción catalizada por las transaminasas (p. 782) en la que el grupo α-amino del aminoácido$_1$ se transfiere al enzima, liberándose entonces como primer producto el α-cetoácido$_1$ recién formado, lo que a su vez va seguido de la fijación del α-cetoácido$_2$ aceptor y de la liberación del aminoácido$_2$. Esta reacción se representa esquemáticamente en la Figura 10.16.

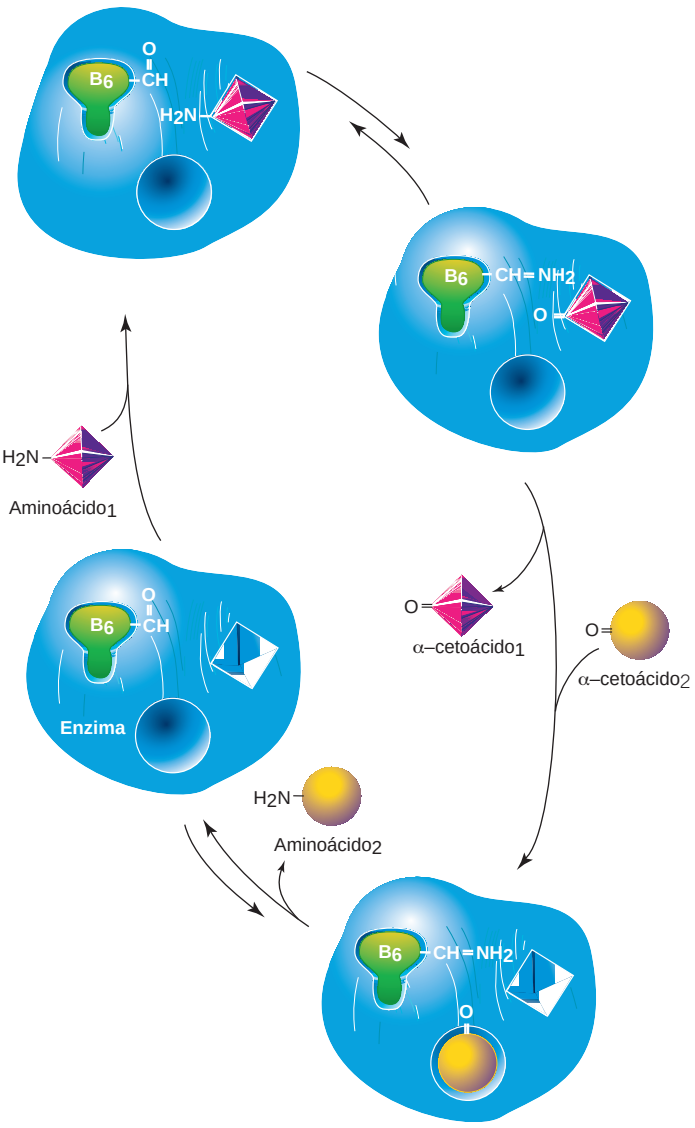
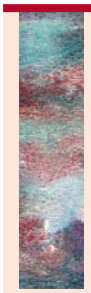


FIGURA 10.16
Representación esquemática del mecanismo de reacción de la transaminasa: un ejemplo de mecanismo ping–pong. El piridoxal fosfato (coenzima de la vitamina B_6) unido al enzima acepta el grupo α-amino del primer aminoácido (aminoácido$_1$) el cual es seguidamente liberado en forma de α-cetoácido. El α-cetoácido aceptor (α-cetoácido$_2$) se fija entonces al enzima y el grupo amino fijado es transferido al mismo formando un nuevo aminoácido que es liberado del enzima a continuación. Los términos "oxo" y "ceto" se usan indistintamente



APLICACIÓN CLÍNICA 10.3

La mutación en un centro de fijación de un coenzima da lugar a una enfermedad clínica

La cistationuria es una enfermedad genética en la que el enzima γ-cistationasa es deficiente o inactivo. La cistationasa cataliza la reacción

cistationina $\leftrightarrow$ cisteína + α-cetobutirato

El déficit del enzima conduce a acumulación de cistationina en el plasma. Dado que la cistationasa es un enzima dependiente de piridoxal fosfato, se administró vitamina B_6 a pacientes cuyos fibroblastos contenían material que reaccionaba cruzadamente con anticuerpo contra la cistationasa. Muchos respondieron a la terapia con B_6 con un descenso en los niveles de cistationina en el plasma. Estos pacientes producían el apoenzima que reaccionó con el anticuerpo. En un paciente determinado, la actividad del enzima era indetectable en homogenados de fibroblastos, pero aumentaba hasta un 31% del normal al añadir piridoxal fosfato 1 mM a la mezcla de ensayo. Se cree que la K_m para la fijación de piridoxal fosfato al enzima es mayor debido a una mutación del centro de fijación. La actividad se recupera parcialmente incrementando la concentración de coenzima. Aparentemente, estos pacientes requieren una concentración de estado estacionario de coenzima mayor para que aparezca la actividad γ-citationasa.

Pascal, T. A., Gaull, G. E., Beratis, N. G., Gillam, B. M., Tallan, H. H. y Hirschhorn, K. Vitamin B_6-responsive and unresponsive cystathionuria: two variant molecular forms. *Science* 190:1209, 1975.

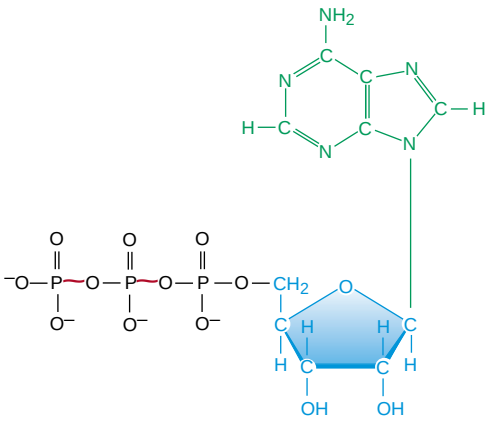


FIGURA 10.17
Adenosina trifosfato (ATP).

En un **mecanismo secuencial**, si los dos sustratos A y B pueden fijarse en cualquier orden, entonces se trata de un mecanismo estadístico; si se requiere la fijación de A antes de que se pueda fijar B, entonces es un mecanismo ordenado. En cualquier caso, la reacción es bimolecular, es decir, que tanto A como B se han de fijar antes de que tenga lugar la reacción. Ejemplos de estos mecanismos pueden encontrarse entre las deshidrogenasas en las que el segundo sustrato es un coenzima (NAD^+, FAD, etc., véase p. 427). En cualquiera de los dos mecanismos, la liberación de los productos puede ser o no ordenada.

10.4 COENZIMAS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Los **coenzimas** son moléculas orgánicas pequeñas, derivadas a menudo de vitaminas, que funcionan en conjunción con el enzima en el proceso catalítico. Frecuentemente, el coenzima tiene una afinidad por el enzima similar a la del sustrato; en consecuencia, el coenzima puede ser considerado como un segundo sustrato. En algunos casos, el coenzima está ligado de forma covalente al apoenzima y, en el proceso catalítico, funciona en el centro activo o cerca de él. Hay otros ejemplos de enzimas en los que el papel del coenzima se encuentra a medio camino entre estos dos extremos.

Varios coenzimas son derivados de vitaminas del grupo B. La vitamina B_6, piridoxina, requiere una pequeña modificación para transformarse en el coenzima activo, el piridoxal fosfato (véase p. 1151). La Apli. Clín. 10.3 pone de manifiesto la importancia del centro de fijación del coenzima, y la manera en que las alteraciones en este centro pueden provocar una disfunción metabólica.

A diferencia de la vitamina B_6, el ácido nicotínico requiere una alteración importante en las células de mamífero antes de poder actuar como coenzima (véase p. 850).

En este capítulo sólo se tratará la estructura y función de dos coenzimas del grupo de las vitaminas B, el ácido nicotínico y la riboflavina, así como del ATP. La estructura y función del coenzima A (CoA) (véase p. 852), tiamina (véase p. 1148), biotina y vitamina B_{12} se incluyen en los capítulos que tratan de los enzimas cuya actividad depende de un coenzima concreto.

La adenosina trifosfato puede ser tanto un segundo sustrato como un modulador de la actividad

La **adenosina trifosfato** (ATP) funciona a menudo como un segundo sustrato, si bien puede también servir de cofactor en la regulación de la actividad de enzimas específicos. Este compuesto es primordial en bioquímica (Figura 10.17) y se sintetiza *de novo* en todas las células de mamíferos. El anillo nitrogenado heterocíclico es la adenina. La combinación de la base, adenina, con la ribosa se conoce como adenosina; de modo que el ATP es adenosina con un trifosfato en el hidroxilo en 5′. El extremo bioquímicamente funcional es el trifosfato reactivo. El enlace fosfato–oxígeno terminal tiene una elevada energía libre de hidrólisis, lo que significa que el fosfato puede ser transferido desde el ATP a otros grupos aceptores. Por ejemplo, el ATP se utiliza como cosustrato por las quinasas para la transferencia del fosfato terminal a diversos aceptores. Un ejemplo típico es la reacción catalizada por la **glucoquinasa**:

$$\text{glucosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{glucosa 6-fosfato} + \text{ADP}$$

El ADP es la adenosina difosfato.

El ATP también actúa como modulador de la actividad de algunos enzimas. Estos enzimas concretos tienen centros de fijación de ATP que, cuando están ocupados, cambian la afinidad o reactividad del enzima hacia sus sustratos. En estos casos, el ATP actúa como un efector alostérico (véase la p. 436).

El NAD y el NADP son coenzimas de ácido nicotínico

El **ácido nicotínico** es el ácido piridina-3-carboxílico. Se convierte en dos coenzimas principales implicados en reacciones de oxidorreducción. Estos coenzimas son el **NAD (nicotinamida adenina dinucleótido)** y el **NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)**. Es conveniente utilizar las abreviaturas NAD y NADP para

referirse a los coenzimas con independencia de su estado de oxidación o reducción. NAD^+ y $NADP^+$ se refieren a las formas oxidadas y NADH y NADPH se refieren a las formas reducidas. Algunas deshidrogenasas son específicas para NADP y otras para NAD; algunas funcionan con ambos coenzimas. Esta disposición permite la especificidad y el control de las deshidrogenasas que residen en el mismo compartimiento subcelular.

El NAD^+ está compuesto por adenosina y *N*-ribosil-nicotinamida unidas a través de un enlace de pirofosfato entre los dos hidroxilos en 5′ de las dos porciones de ribosa (Figura 10.18). El NADP difiere estructuralmente del NAD en que tiene un fosfato adicional esterificado con el hidroxilo en 2′ de la porción de adenosina. Ambos coenzimas actúan como intermedios en la transferencia de dos electrones entre un dador y un aceptor electrónicos. No es necesario que el dador y el aceptor estén involucrados en la misma ruta metabólica. Dicho de otro modo, la forma reducida de estos nucleótidos actúa como un "pool", o fondo común de electrones que provienen de muchas reacciones oxidativas y que puede ser utilizado por diversas reacciones reductoras. Los componentes adenina, ribosa y pirofosfato del NAD están implicados en su fijación al enzima. Los enzimas que requieren NADP no tienen el residuo de aspartato conservado que está presente en el sitio de fijación de NAD. Si el aspartato estuviera presente, una interacción carga–carga entre el aspartato cargado negativamente y el fosfato en 2′ del NADP evitaría la fijación. Debido a que en el hidroxilo en 2′ del NAD no existe un fosfato cargado negativamente, se puede producir la discriminación entre la fijación de NAD y NADP. La nicotinamida está implicada en la aceptación y donación reversible de dos electrones a la vez. Esto constituye el centro activo del coenzima. En la oxidación del etanol deuterado por la alcohol deshidrogenasa, el NAD^+ acepta dos electrones y el deuterio del etanol, mientras que el otro hidrógeno se libera en forma de protón (Figura 10.19).

La fijación del NAD^+ a la superficie enzimática confiere a la nicotinamida plana una "cara superior" y una "cara inferior" químicamente reconocibles. La primera se conoce como cara **A**, y la segunda como cara **B**. En el caso de la alcohol deshidrogenasa, el protón o el ion deuterio que actúa de trazador y los dos electrones se adicionan a la cara A. Otras deshidrogenasas utilizan la cara B. El efecto antes mencionado demuestra de qué forma los enzimas son capaces de inducir **estereoespecificidad** en reacciones químicas en virtud de la fijación asimétrica del coenzima y de sustratos.

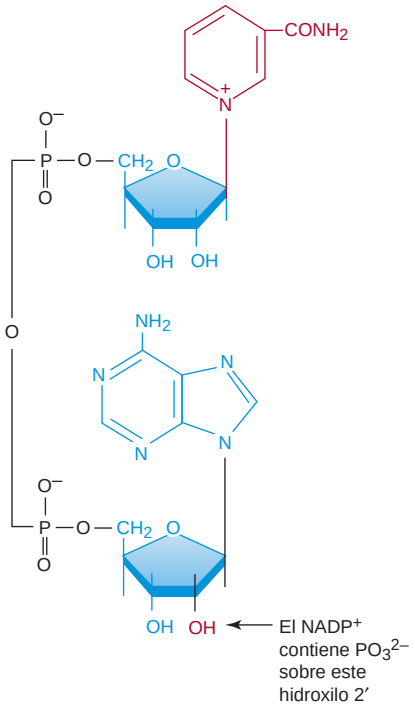


FIGURA 10.18
Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+).

El FMN y el FAD son coenzimas de riboflavina

Las dos formas coenzimáticas de la riboflavina son **FMN (flavina mononucleótido)** y **FAD (flavina adenina dinucleótido)**. La vitamina riboflavina consta de un anillo heterocíclico, la isoaloxacina (flavina), conectada a través del N-10 al alcohol ribitol (Figura 10.20). El FMN tiene un fosfato esterificado en el hidroxilo 5′ del ribitol. El FAD es estructuralmente análogo al NAD, al tener una adenosina ligada a través de un enlace pirofosfato a un anillo heterocíclico, en este caso la riboflavina (Figura 10.21). El FAD y el FMN funcionan en reacciones de oxidación–reducción aceptando y donando dos electrones a través del anillo de isoaloxacina. Un ejemplo típico de participación del FAD en una reacción enzimática es la oxidación del succinato a fumarato por la succinato deshidrogenasa (véase p. 556) (Figura 10.22). En algunos casos, estos coenzimas son aceptores de un electrón, lo que conduce a la formación de flavina semiquinona (radical libre).

Existe una tendencia de los coenzimas de flavina a fijarse a sus apoenzimas mucho más fuertemente que los coenzimas del ácido nicotínico, por lo que actúan más a menudo como grupos prostéticos que como coenzimas.

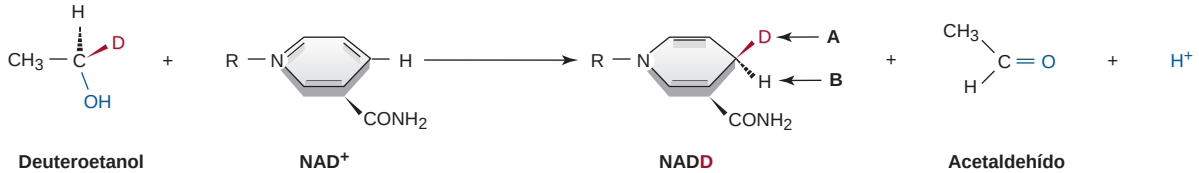


FIGURA 10.19
Transferencia estereoespecífica de deuterio del etanol deuterado al NAD^+.

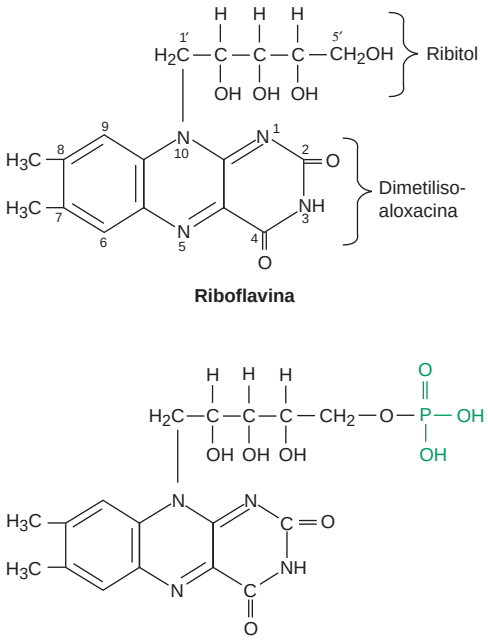


FIGURA 10.20
Riboflavina y flavina mononucleótido.

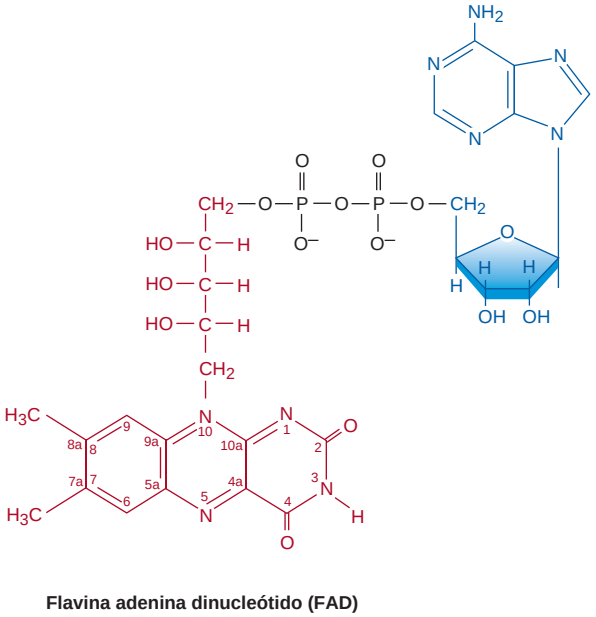


FIGURA 10.21
Flavina adenina dinucleótido (FAD).

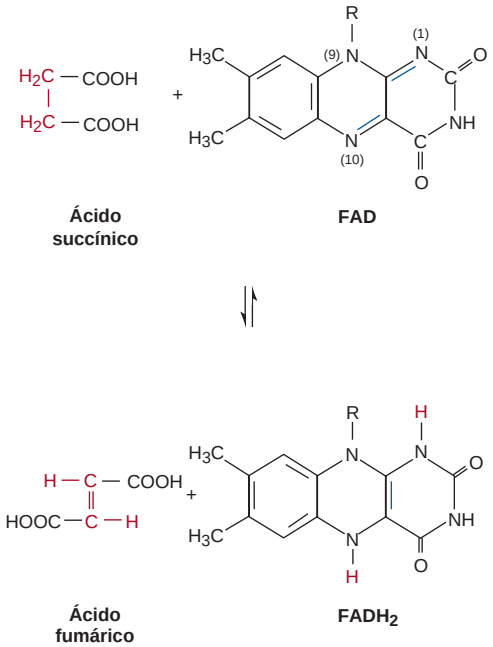


FIGURA 10.22
El FAD es el coenzima de la reacción de la succinato deshidrogenasa.

Los cofactores metálicos tienen diversas funciones

Los metales no son coenzimas en el sentido del FAD, FMN, NAD^+ y $NADP^+$, pero se requieren como cofactores en aproximadamente los dos tercios de enzimas conocidos. Los metales participan en reacciones enzimáticas bien actuando como ácidos de Lewis, bien mediante varios modos de formación de quelatos. Los **quelatos** son compuestos de coordinación organometálicos. Un buen ejemplo de quelato es el complejo entre el hierro y la protoporfirina IX para formar un hemo (véase p. 1063). Los metales que actúan como catalizadores tipo ácido de Lewis se encuentran entre los metales de transición tales como Zn, Fe, Mn y Cu, que tienen orbitales electrónicos *d* vacíos que pueden actuar como sumideros electrónicos. Los metales alcalinos tales como K y Na no tienen esta capacidad. Un buen ejemplo de metal que actúa como ácido de Lewis se encuentra en la **carbónico anhidrasa**, un enzima que contiene zinc y que cataliza la reacción

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

La primera etapa (Figura 10.23) se puede visualizar como la generación, *in situ*, de un protón y un grupo hidroxilo a partir de la unión del agua al zinc (función de ácido de Lewis del zinc). A continuación se produce una adición del protón y del hidroxilo al dióxido de carbono, liberándose así ácido carbónico. De hecho, las reacciones que en la figura se presentan en etapas pueden tener lugar en forma concertada, es decir, todas al mismo tiempo.

Los metales también pueden inducir la catálisis bien al unirse al sustrato y favorecer la catálisis electrofílica en el lugar de ruptura del enlace, bien al estabilizar intermediarios de la ruta de reacción. En el caso de la **carboxipeptidasa** y la **termolisina**, dos proteasas con zinc cuyos centros activos son idénticos, el papel del zinc es el de generar un grupo hidroxilo a partir del agua, estabilizando a continuación el estado de transición que se forma por ataque del hidroxilo sobre el enlace peptídico. La Figura 10.24 ilustra la generación del hidroxilo del centro activo por el zinc. Como se puede observar en la figura, el Glu 270 actúa como base tomando el protón del agua. La estabilización del estado de transición tetraédrico por el zinc se muestra en la Figura 10.25. El zinc positivo proporciona el contraión que estabiliza los oxígenos negativos sobre el carbono tetraédrico.

Papel del metal como elemento estructural

El funcionamiento de un metal como ácido de Lewis en la carbónico anhidrasa y la carboxipeptidasa requiere la formación de quelato. Entre metal, enzima y sustrato

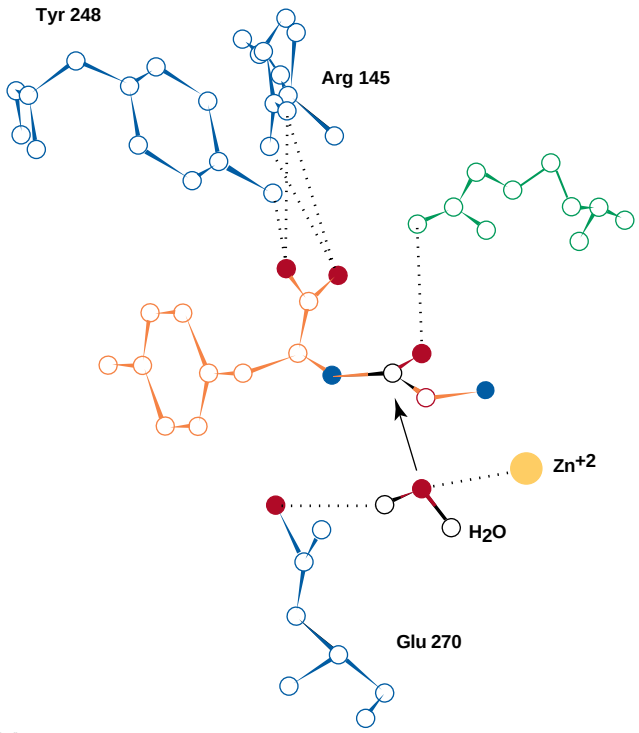


FIGURA 10.24
Papel del zinc en el mecanismo de reacción de la carboxipeptidasa A.
El zinc unido al enzima genera la aparición de un grupo hidroxilo nucleofílico en una molécula de agua ligada, que ataca al carbonilo del enlace peptídico, tal como indica la flecha. El Glu 270 actúa como asistente atrayendo el protón de la molécula de agua unida al zinc. *Adaptado de Lipscomb, W. N.* Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res. *15:140, 1971.*

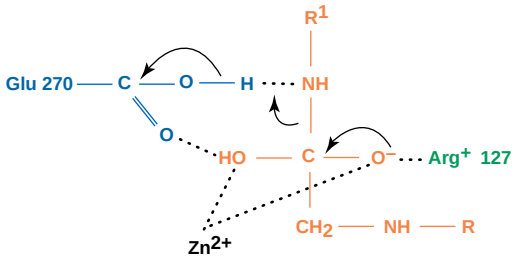


FIGURA 10.25
Estabilización del estado de transición del intermedio tetraédrico por el zinc.
La carga positiva del zinc estabiliza la carga negativa que se genera sobre los oxígenos del carbono tetraédrico en el estado de transición. A continuación, el intermedio tetraédrico colapsa, en la forma indicada por las flechas, dando lugar a la rotura del enlace peptídico.

se dan diversos modos de quelación que son de naturaleza estructural y en los que no se produce catálisis ácida.

En varias quinasas, la creatina quinasa es el mejor ejemplo, el verdadero sustrato no es el ATP sino el Mg^{2+}–ATP (Figura 10.26). En este caso, el Mg^{2+} no interacciona directamente con el enzima. Puede servir para neutralizar la densidad de carga negativa sobre el ATP y facilitar la fijación al enzima. Los complejos ternarios de esta configuración se conocen como complejos "ligados por el sustrato", y se pueden representar esquemáticamente como Enz–S–M. Un esquema hipotético de la fijación de Mg^{2+}–ATP y glucosa en el centro activo de la hexoquinasa se muestra en la Figura 10.27. Todas las quinasas excepto la piruvato quinasa muscular y la fosfoenol piruvato carboxiquinasa forman complejos ligados por el sustrato.

En la piruvato quinasa el Mg^{2+} sirve para quelar el ATP al enzima. La ausencia del cofactor metálico hace que el ATP sea incapaz de unirse al enzima. Los enzimas de esta clase son complejos ternarios "ligados por metal", Enz–M–S. Los **metaloenzimas** son de este tipo y contienen un metal de transición fuertemente unido,

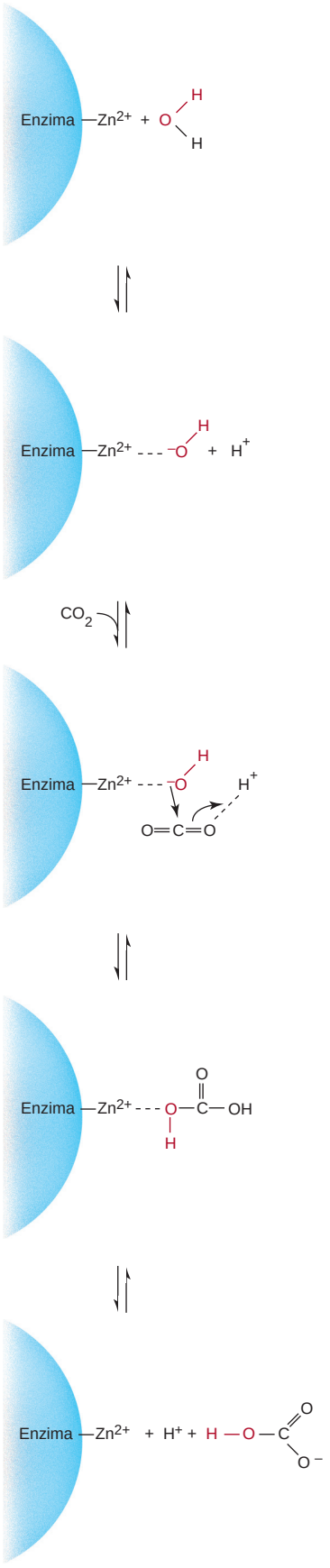


FIGURA 10.23
El zinc actúa como ácido de Lewis en la carbónico anhidrasa.

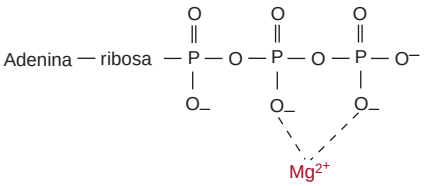


FIGURA 10.26
Estructura del Mg^{2+}–ATP.

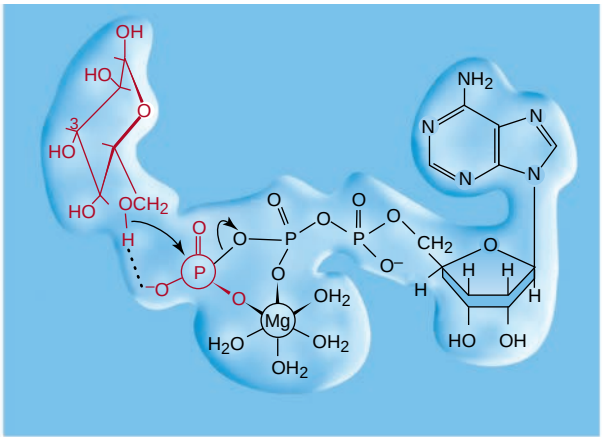


FIGURA 10.27
Papel del magnesio como complejo ligado por el sustrato en el centro activo de las quinasas.
En la hexoquinasa el fosfato terminal del ATP se transfiere a la glucosa dando glucosa 6-fosfato. El magnesio se coordina con el ATP para formar el verdadero sustrato y, además, puede labilizar el enlace P—O del ATP para favorecer la transferencia del fosfato a la glucosa. Hay centros específicos de fijación (en azul claro) en el enzima para la glucosa (parte superior izquierda en rojo) así como para las porciones de adenina y ribosa del ATP (en negro).

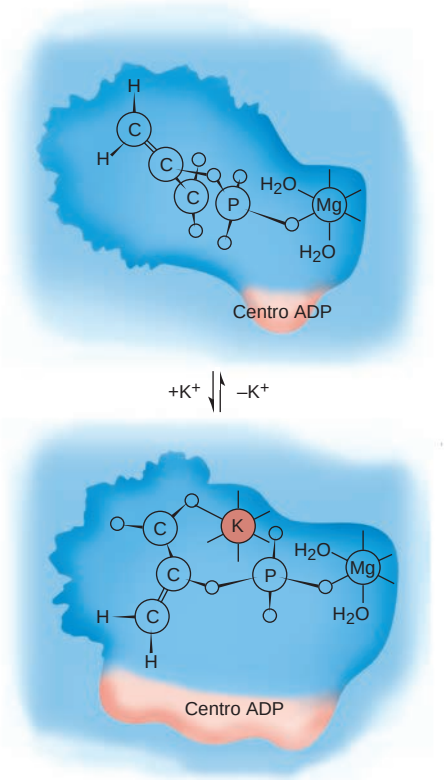


FIGURA 10.28
Modelo del papel del ion potasio en el centro activo de la piruvato quinasa.
La piruvato quinasa cataliza la reacción: fosfoenolpiruvato + ADP ⟶ ATP + piruvato. La fijación inicial del K^+ induce cambios conformacionales en la quinasa que dan lugar a una afinidad más elevada hacia el fosfoenolpiruvato. Además, el K^+ orienta el fosfoenolpiruvato en la posición correcta para la transferencia de su fosfato al ADP (no se muestra). El magnesio coordina el sustrato con el centro activo del enzima.
Modificado con autorización de A. S. Mildvan, Annu. Rev. Biochem., *43:365, 1974. Copyright © 1974 by Annual Reviews, Inc.*

tal como Zn^{2+} o Fe^{2+}. Diversos enzimas que catalizan reacciones de enolización y eliminación son complejos ligados por metal.

Además del papel de fijar enzima y sustrato, los metales también pueden fijarse directamente al enzima para estabilizarlo en la conformación activa o, acaso, para inducir la formación de un centro de fijación o centro activo. Los metales fuertemente quelados como el Mn^{2+} no son los únicos que juegan un papel importante en este aspecto, sino que también son importantes los metales alcalinos débilmente unidos (Na^+, K^+). En la piruvato quinasa, el K^+ induce un cambio conformacional inicial que es necesario, pero no suficiente, para la formación del complejo ternario. Tras la fijación del sustrato, el K^+ induce un segundo cambio conformacional en el complejo ternario catalíticamente activo, tal como se indica en la Figura 10.28. De este modo, el Na^+ y el K^+ estabilizan la conformación activa del enzima, pero son pasivos desde el punto de vista catalítico.

Papel de los metales en la oxidación y la reducción

Las **proteínas ferrosulfuradas**, a menudo denominadas proteínas férricas no hemo, son una clase única de metaloenzimas en los que el centro activo consta de uno o más agrupamientos de quelatos de hierro ligados por azufre. Sus estructuras se presentan en la p. 568. En algunos casos, el azufre procede únicamente de la cisteína, mientras que en otros lo hace tanto de la cisteína como de un ion de azufre libre. El azufre libre se libera en forma de ácido sulfhídrico por acidificación. Estos enzimas con hierro no hemo tienen potenciales de reducción (E_0') bastante bajos y funcionan en reacciones de transferencia de electrones (véase p. 567).

Los **citocromos** son proteínas con hierro hemo que actúan como cosustratos de sus respectivas reductasas (véase p. 571). El hierro de los hemos de los citocromos sufre transferencias reversibles de un electrón. El hemo está unido a la apoproteína mediante coordinación de la cadena lateral de un aminoácido al hierro del hemo. Así el metal no tiene sólo un papel estructural, sino que también participa en el proceso químico.

Los metales, específicamente el cobre y el hierro, también tienen un papel en la activación del oxígeno molecular. El cobre es un participante activo en varios enzimas de tipo oxidasa e hidroxilasa. Por ejemplo, la **dopamina β-hidroxilasa** cataliza la introducción de un átomo de oxígeno desde el O_2 a la dopamina, formando noradrenalina (Figura 10.29). La forma activa del enzima contiene un ion cuproso que reacciona con el oxígeno para formar un complejo activado oxígeno–cobre. Se cree que el complejo cobre–hidroperóxido, que se muestra en la Figura 10.29, se convierte en una especie cobre(II)–O^- que actúa como "oxígeno activo" en la hidroxilación de la DOPA. En otros metaloenzimas, se producen y se utilizan otras especies de "oxígeno activo" para la hidroxilación.

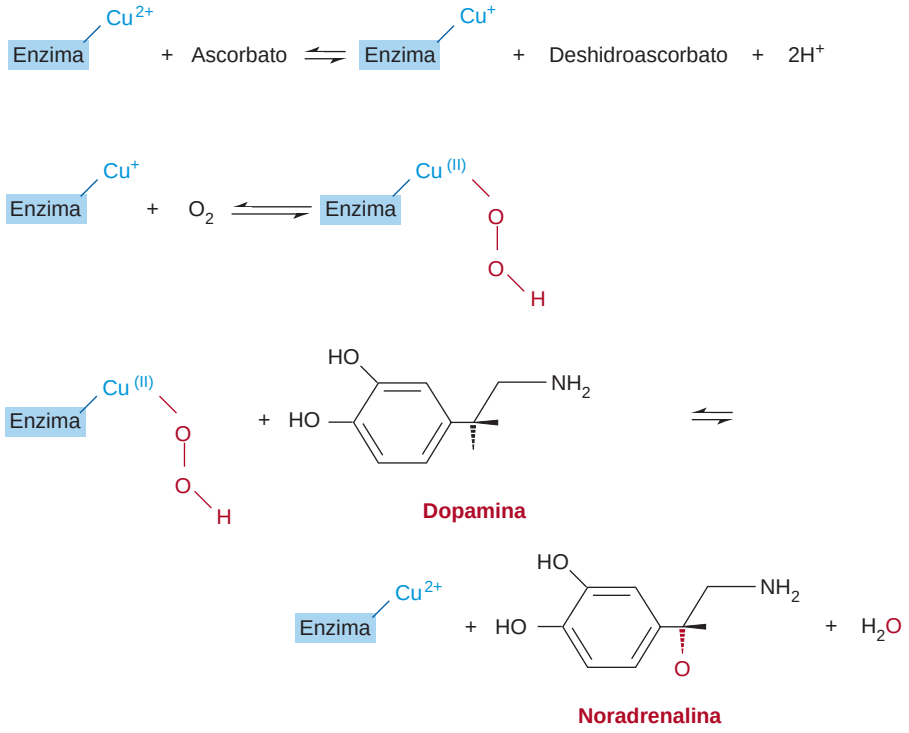


FIGURA 10.29
Papel del cobre en la activación del oxígeno molecular por la dopamina hidroxilasa. La forma habitual del enzima cúprico no reacciona con el oxígeno, pero al ser reducida por el cosustrato, el ascorbato, se genera un oxígeno reactivo unido al cobre del enzima, que a continuación reacciona con la dopamina para formar noradrenalina y un enzima cúprico inactivo.

10.5 INHIBICIÓN DE LOS ENZIMAS

Anteriormente se mencionó la inhibición por producto de la actividad enzimática y cómo se podía controlar o modular toda una vía metabólica mediante este mecanismo (p. 425). Además de la inhibición por el producto inmediato, un enzima determinado puede ser también inhibido o incluso activado por los productos de otros enzimas. Gran parte de la terapia por fármacos está basada en la inhibición de enzimas específicos mediante un análogo del sustrato. Existen tres clases principales de inhibidores: competitivos, no competitivos y acompetitivos.

La inhibición competitiva puede compensarse con el incremento en la concentración de sustrato

Los **inhibidores competitivos** son aquellos inhibidores cuya acción puede ser contrarrestada por cantidades crecientes de sustrato. Los inhibidores competitivos son estructuralmente similares al sustrato y se unen al centro de fijación de sustrato, compitiendo con éste por el enzima. Una vez unido, el enzima no puede convertir el inhibidor en productos. Debido a la ley de acción de masas, concentraciones crecientes de sustrato desplazan al inhibidor fijado reversiblemente. Por ejemplo, en la reacción de la succinato deshidrogenasa, el malonato es estructuralmente similar al succinato y es un inhibidor competitivo (Figura 10.30).

La Apli. Clín. 10.4 ilustra de qué modo se pueden utilizar diferencias muy sutiles en el sitio activo de dos enzimas similares para diseñar un inhibidor que inhibe diferencialmente los dos enzimas.

Dado que el sustrato y el inhibidor compiten por el mismo centro del enzima, la K_m del sustrato muestra un incremento aparente en presencia del inhibidor. Esto queda plasmado en una gráfica de doble recíprocos como un desplazamiento en la intersección en el eje de las x (esto es, $-1/K_m$) y en la pendiente de la línea ($K_m/V_{máx}$). Si en primer lugar establecemos la velocidad a diferentes concentraciones de sustrato, y después repetimos el experimento con una canti-

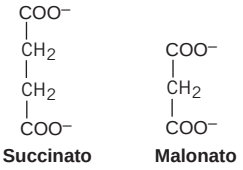
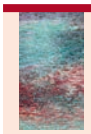


FIGURA 10.30
Sustrato e inhibidor de la succinato deshidrogenasa.

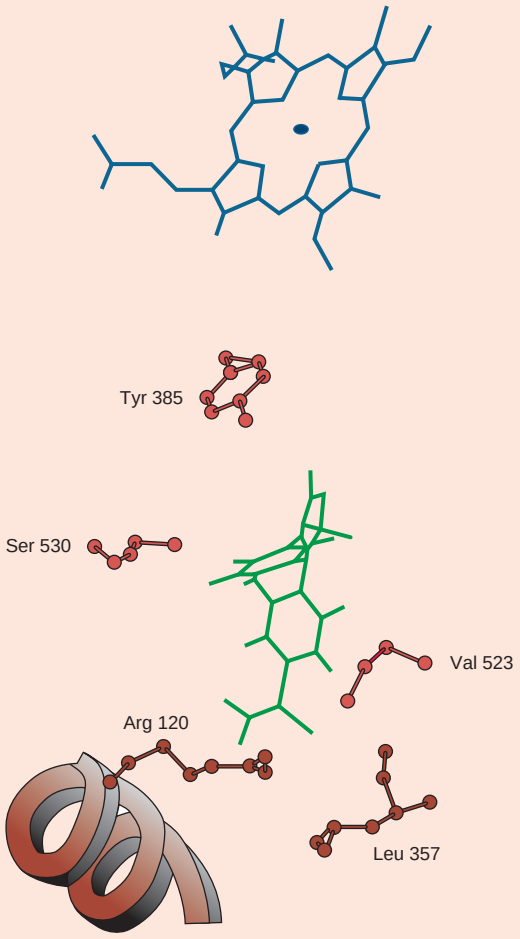


APLICACIÓN CLÍNICA 10.4
Diseño de un inhibidor selectivo

Las prostaglandinas constituyen una clase muy importante de hormonas paracrinas derivadas de ácidos grasos insaturados de cadena larga (p. 766). En una de las primeras etapas de su síntesis interviene el enzima ciclooxigenasa (COX). Entre los muchos efectos fisiológicos de las prostaglandinas se cuentan el dolor y la inflamación asociados con la artritis. Tradicionalmente la artritis se ha tratado con aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroides de los que se ha demostrado que actúan inhibiendo las ciclooxigenasas (p. 768) y, por tanto, disminuyen los niveles de prostaglandinas "malas" causantes de los síntomas. Un problema serio con estos fármacos es la aparición de hemorragias gastrointestinales y perforación causados por una disminución concomitante de las prostaglandinas "buenas" que son protectoras de la mucosa gastrointestinal.

Recientemente se ha observado que existen dos ciclooxigenasas diferentes, COX-1 y COX-2 (p. 768) que presentan diferente distribución tisular. El enzima COX-2 es inducible por mediadores de la enfermedad artrítica mientras que la COX-1 fabrica, de forma constitutiva, las prostaglandinas protectoras de la mucosa. La única diferencia significativa en los sitios activos de los dos enzimas es que la COX-2 tiene una valina en lugar de una isoleucina en la posición 523. La valina de menor tamaño permite la fijación preferente de inhibidores hechos a medida, lo que provoca la inhibición selectiva de la COX-2. Un tal fármaco diseñado a propósito, Vioxx™ (en verde) se muestra modelizado en el sitio activo de la COX-1.

Las cadenas laterales de aminoácidos clave que forman la bolsa de fijación del sustrato se muestran en rojo, y el hemo, que participa en la síntesis de prostaglandinas, se muestra en azul. Se ha demostrado que la aspirina acetila la Ser 530 tanto en la COX-1 como en la COX-2 mientras que Vioxx™ se une selectivamente, e inhibe, la COX-2, preservando así la producción de prostaglandinas "buenas" por la COX-1. El grupo fenilo de la aspirina ocupa una localización idéntica en el sitio activo que el grupo fenilo de Vioxx. Inicialmente los fármacos tipo Vioxx parecen ser inhibidores competitivos, pero con COX-2 y no con COX-1, mostrando una inhibición irreversible dependiente del tiempo que no implica un enlace covalente. Vioxx apareció en el mercado el año 2000 y ha producido una tremenda diferencia en la calidad de vida de los pacientes artríticos.



Gierse, J. K., McDonald, J. J., Hauser, S. D., Rangwala, S. H., Koboldt, C. M. y Seibert K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271:15810, 1996.

dad determinada pero constante de inhibidor a diferentes concentraciones de sustrato, entonces se obtienen dos líneas rectas (Figura 10.31). Como puede observarse, la $V_{máx}$ no cambia; de ahí que la intersección en el eje de las *y* sea el mismo. En presencia del inhibidor, la intersección en el eje de las *x* ya no es el inverso negativo de la verdadera K_m, sino que es un valor aparente, $K_{m,app}$ en donde

$$K_{m,app} = K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

Así, la constante del inhibidor, K_I, puede determinarse a partir de la concentración de inhibidor [I] utilizado y de la K_m obtenida de la intersección en el eje de las *x* de la línea obtenida en ausencia de inhibidor.

Los inhibidores no competitivos no impiden la unión de sustrato

Un **inhibidor no competitivo** se fija en un centro diferente del centro de fijación del sustrato. Su inhibición no es contrarrestada mediante concentraciones crecien-

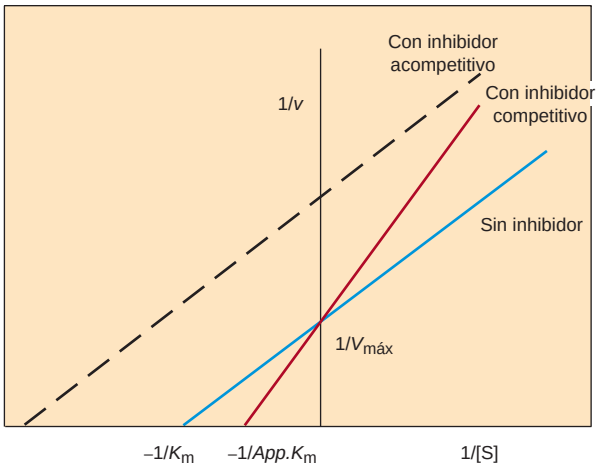


FIGURA 10.31
Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición competitiva y acompetitiva.
Un inhibidor competitivo se une al centro de fijación del sustrato incrementando efectivamente la K_m para el sustrato. Un inhibidor acompetitivo provoca una variación equivalente tanto en la K_m como en la $V_{máx}$, lo que da lugar a una línea paralela a la del enzima no inhibido.

tes de sustrato. Se forman complejos binarios (EI) y ternarios (EIS), siendo ambos catalíticamente inactivos y, por tanto, complejos finales. El inhibidor no competitivo actúa como si eliminase enzima activo de la solución, lo que da lugar a una disminución de $V_{máx}$. Este efecto se puede apreciar gráficamente en la representación de los dobles recíprocos (Figura 10.32), en donde K_m no cambia pero sí lo hace $V_{máx}$. La inhibición puede ser a menudo contrarrestada mediante diálisis exhaustiva del enzima inhibido, siempre que el inhibidor no haya reaccionado covalentemente con el enzima. Este caso se considera en el apartado de inhibidores irreversibles que se trata más adelante.

El **inhibidor acompetitivo** sólo se fija a la forma ES del enzima en el caso de un enzima con un solo sustrato. El resultado es un cambio aparente equivalente de K_m y de $V_{máx}$ que queda reflejado en la gráfica de dobles recíprocos como una línea paralela a la del enzima no inhibido (Figura 10.31). En el caso de enzimas con varios sustratos, la interpretación es compleja y no nos adentraremos en su consideración.

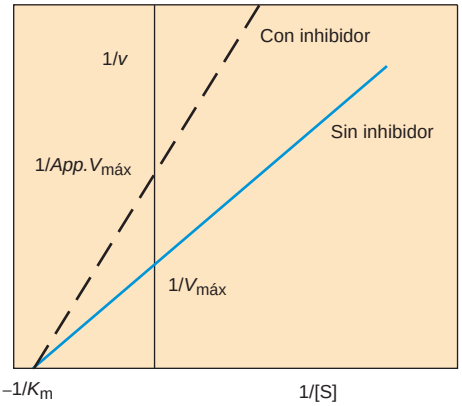


FIGURA 10.32
Gráfica de dobles recíprocos de un enzima sujeto a inhibición no competitiva reversible.
Un inhibidor no competitivo se une a un centro diferente del centro de fijación del sustrato; por tanto, la K_m efectiva no cambia pero disminuye la $V_{máx}$ aparente.

La inhibición irreversible requiere una modificación covalente de un sitio del enzima

En los casos de modificación covalente del centro de fijación o del centro activo, la inhibición no será reversible por diálisis a menos que el enlace sea químicamente lábil, como en el caso de un éster o un tioéster. El tiol del centro activo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa reacciona con ***p*-cloromercuribenzoato** formando un compuesto covalente de mercuribenzoato con el enzima (Figura 10.33). Tales compuestos no desaparecen por diálisis o adición de sustrato. Las gráficas de dobles recíprocos muestran el patrón de la inhibición no competitiva (Figura 10.32). Muchos pesticidas actúan alquilando la serina del sitio activo de la acetilcolina esterasa, inhibiendo así la función nerviosa. No obstante, se puede reactivar la esterasa mediante un nucleófilo fuerte tal como se indica en la Apli. Clín. 10.5.

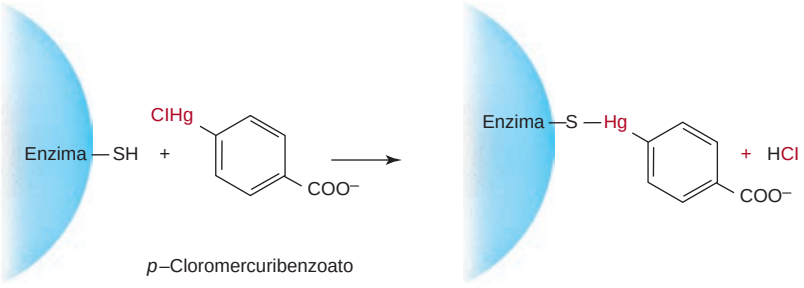
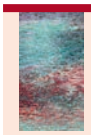
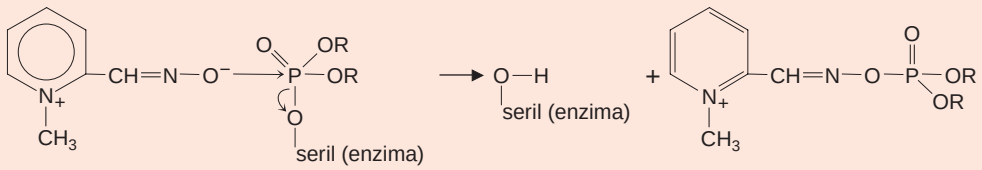


FIGURA 10.33
Inhibición enzimática por modificación covalente de una cisteína del centro activo.



APLICACIÓN CLÍNICA 10.5
Un caso de envenenamiento

El personal de urgencias se encuentra con muchos casos de envenenamiento por pesticidas por lo que deben estar preparados para reconocer y tratar estos casos. Muchos de los insecticidas corrientes son compuestos organofosforados que inhiben irreversiblemente la acción de la acetilcolina esterasa, AChE, en las fibras postsinápticas de las neuronas colinérgicas (p. 998) al formar ésterres fosfato estables con una serina específica del sitio activo de la esterasa. La inhibición de la AChE impide la hidrólisis de la acetilcolina en la sinapsis lo que produce la estimulación constante de los órganos finales de esas neuronas. Los efectos más prominentes del envenenamiento con pesticidas en el hombre son la parálisis de los músculos respiratorios y el edema pulmonar. Si se administra tempranamente, un fármaco tal como la Pralidoxima puede desplazar el alquilfosfato del pesticida fijado a la serina del sitio activo y regenerar una AChE activa.



En la enfermedad miastenia gravis, el envenenamiento de la AChE constituye una buena práctica médica. En esta enfermedad existe una disminución funcional en la cantidad de receptor postsináptico de acetilcolina. Una forma de superar este déficit consiste en aumentar los niveles de acetilcolina tratando al paciente con un inhibidor de la AChE.

Main, R. En: E. Hodgson y F. E. Guthrie (Eds.) *Introduction to Biochemical Toxicology*. New York: Elsevier, 1980, pp. 193–223.

Muchos fármacos son inhibidores enzimáticos

Gran parte de la farmacoterapia moderna está basada en los conceptos de la inhibición enzimática que se contemplaron en la sección anterior. Los fármacos se diseñan con vistas a la inhibición de un enzima específico de una ruta metabólica específica. Esta aplicación se aprecia fácilmente en los fármacos antivíricos, antibacterianos y antitumorales que se administran al paciente en condiciones de toxicidad limitada. Esta toxicidad es, a menudo, inevitable, ya que, con excepción de la biosíntesis de la pared celular bacteriana, existen pocas rutas metabólicas críticas únicas de los tumores, virus o bacterias. De aquí que los fármacos que matan estos organismos también matan a menudo a la célula huésped. La única característica de la que se puede obtener provecho es el tiempo de generación relativamente corto de los organismos indeseables. Son mucho más sensibles a los antimetabolitos, y en particular a los que inhiben los enzimas implicados en la replicación. Los **antimetabolitos** son compuestos con alguna diferencia estructural respecto a los sustratos naturales y son inhibidores. En capítulos posteriores se describirán numerosos ejemplos de antimetabolitos. Aquí sólo presentaremos unos pocos ejemplos que ilustren el concepto.

Sulfamidas

La quimioterapia moderna se inició con estos compuestos, cuya fórmula general es $R—SO_2—NHR'$. La **sulfanilamida**, que es el miembro más sencillo de la clase, es un agente antibacteriano debido a su competición con el **ácido *p*-aminobenzoico** (PABA) requerido para el crecimiento bacteriano. En la Figura 10.34 se muestra la estructura de estos compuestos.

Las bacterias no pueden absorber el ácido fólico, una vitamina necesaria para el huésped, sino que han de sintetizarlo. Como la sulfanilamida es un análogo estructural del *p*-aminobenzoato, el enzima dihidropteroato sintetasa fabrica un intermedio que contiene sulfanilamida, el cual no puede ser convertido en folato. La Figura 10.35*b* muestra la forma completamente reducida o coenzimática del folato.

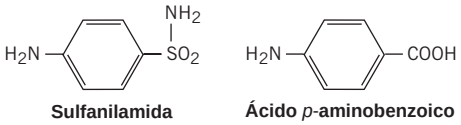


FIGURA 10.34
Estructura del ácido *p*-aminobenzoico y de la sulfanilamida, un inhibidor competitivo.

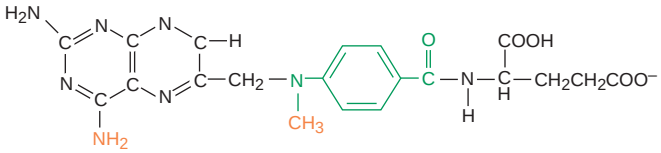


FIGURA 10.35
Metotrexato (ácido 4-amino-N^{10}-metilfólico) y ácido tetrahidrofólico.
En verde se muestra la contribución del *p*-aminobenzoato.

Así, la bacteria carece del folato requerido, con lo que no puede crecer o dividirse. Dado que el hombre requiere folato de fuentes externas, la sulfanilamida no es dañina en las mismas dosis que matan a las bacterias.

Metotrexato

La biosíntesis de purinas y pirimidinas, bases heterocíclicas utilizadas en la síntesis de RNA y DNA, requiere **ácido fólico**, que actúa de coenzima en la transferencia de unidades monocarbonadas desde diferentes aminoácidos dadores (véase p. 794). El **metotrexato** (Figura 10.35*a*), análogo estructural del folato, se ha utilizado con gran éxito en la leucemia infantil. Su mecanismo de acción se basa en la competición con el dihidrofolato por la **dihidrofolato reductasa**. Se fija 1000 veces más fuertemente que el sustrato natural, y es un potente inhibidor competitivo del enzima. La síntesis de timidina monofosfato se detiene en presencia de metotrexato, a causa del fallo de la reacción de transferencia de la unidad monocarbonada. Dado que la división celular depende de la timidina monofosfato, así como de los otros nucleótidos, la célula leucémica no se puede multiplicar. Uno de los problemas radica en que las células humanas que se dividen rápidamente, tales como las de la médula ósea y la mucosa intestinal, son sensibles al fármaco por las mismas razones. Además, la utilización prolongada induce la amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa, lo que incrementa los niveles del enzima y provoca el crecimiento preferencial de las células resistentes.

Antimetabolitos no clásicos

Un antimetabolito no clásico es un sustrato de un enzima que, por acción de éste, se transforma en un producto con un grupo químico muy reactivo que forma un complejo covalente con la cadena lateral de un aminoácido en el centro activo, provocando la inactivación irreversible del enzima. Un ejemplo de este tipo de inhibidor es el fármaco Omeprazol utilizado en el tratamiento de la acidez de estómago excesiva. Estos inhibidores se conocen como **sustratos suicidas** y son muy específicos.

Otro grupo de inhibidores contiene un grupo funcional reactivo situado fuera del sitio activo. Por ejemplo, el compuesto de la Figura 10.36 es un inhibidor irreversible para la dihidrofolato reductasa, porque se une específicamente a la reductasa y el sulfonil fluoruro reactivo está colocado de manera que reacciona con el grupo hidroxilo de una serina en el centro de fijación del sustrato. La unión covalente de este análogo de sustrato con el enzima impide la fijación del sustrato normal e inhibe el enzima.

Otros antimetabolitos

Con el fin de poner de relieve la semejanza estructural de los agentes quimioterápicos con los sustratos normales se mencionan otros dos análogos de las purinas y

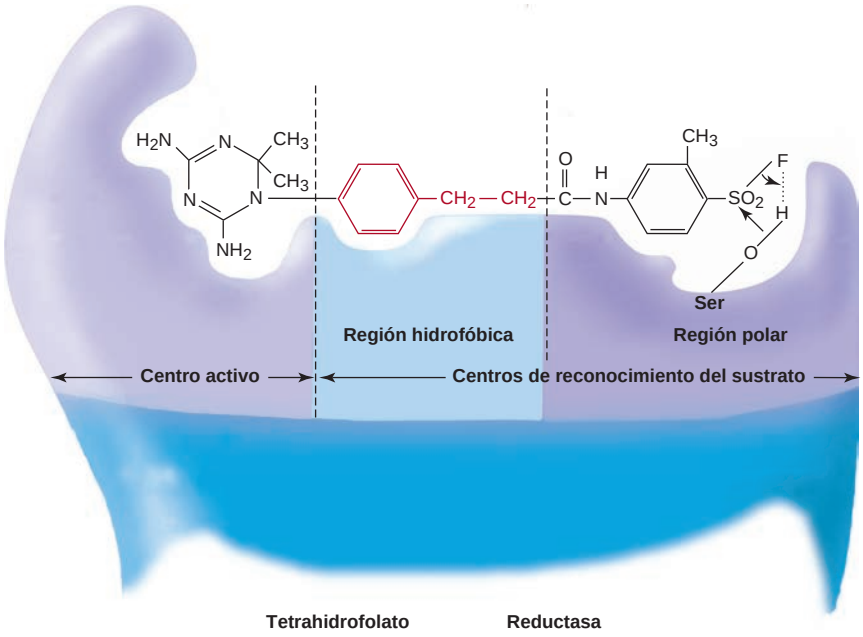


FIGURA 10.36
Inactivación dirigida al centro de la tetrahidrofolato reductasa.
El inhibidor irreversible, una dihidrotriazina sustituida, se parece estructuralmente al dihidrofolato y se une específicamente al centro del dihidrofolato en la dihidrofolato reductasa. La porción de triazina del inhibidor se parece a la porción pterina y se fija, por tanto, en el centro activo. El grupo etilbenceno (en rojo) se une al centro hidrofóbico ocupado normalmente por el grupo *p*-aminobenzoilo. El extremo reactivo del inhibidor contiene un sulfonilfluoruro reactivo que forma un enlace covalente con el hidroxilo de una serina de la superficie enzimática. De este modo, el inhibidor inhibe irreversiblemente el enzima al bloquear el acceso del dihidrofolato al centro activo.

pirimidinas. El **fluorouracilo** (Figura 10.37) es un análogo de la timina en el cual el metilo unido al anillo ha sido sustituido por un flúor. El desoxinucleótido de este compuesto es un inhibidor irreversible de la timidilato sintetasa. La **6-mercaptopurina** (Figura 10.37) es un análogo de la hipoxantina, adenina y guanina, que en las células se convierte en nucleótido de 6-mercaptopurina. Este nucleótido es un antimetabolito de amplio espectro debido a su competición en muchas reacciones en las que intervienen nucleótidos de adenina y guanina. La 6-mercaptopurina es muy efectiva en el tratamiento de las leucemias infantiles. Los antimetabolitos comentados están relacionados con el metabolismo de purinas y pirimidinas, pero los conceptos generales pueden aplicarse a cualquier enzima o ruta metabólica.

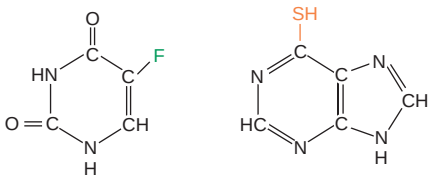


FIGURA 10.37
Estructura de dos antimetabolitos.

10.6 | CONTROL ALOSTÉRICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los efectores alostéricos se unen a sitios diferentes de los sitios de fijación de sustrato

Aunque el centro de fijación del sustrato y el centro activo de un enzima son estructuras bien definidas, la actividad de muchos enzimas puede ser controlada por ligandos que actúan de maneras diferentes de las de los inhibidores competitivos o no competitivos. Un **ligando** es cualquier molécula unida a una macromolécula; el término no se limita a pequeñas moléculas orgánicas tales como el ATP, sino que se extiende a proteínas de bajo peso molecular. Los ligandos pueden ser activadores, inhibidores o incluso sustratos de los enzimas. Los ligandos que producen un cambio de la actividad enzimática, pero que no se modifican como resultado de la acción enzimática, se denominan efectores, modificadores o moduladores. La mayoría de los enzimas sujetos a modulación por ligandos son enzimas determinantes de la velocidad de rutas metabólicas. Para poder apreciar los mecanismos de control de las rutas metabólicas deben conocerse previamente los principios que gobiernan el comportamiento alostérico y cooperativo de los enzimas.

Los enzimas que responden a moduladores tienen centros adicionales conocidos como centros alostéricos. **Alostérico** proviene del griego *allo*, que significa "el otro". Un centro alostérico es una región específica del enzima diferente del centro de fijación de sustrato. La existencia de centros alostéricos queda ilustrado en la Apli. Clín. 10.6. Los ligandos que se fijan en los centros alostéricos se conocen como efectores o moduladores alostéricos. La fijación del efector alostérico provoca un cambio conformacional en el enzima de modo que también cambia la afinidad hacia el sustrato u otros ligandos. Los efectores alostéricos positivos (+) incrementan la afinidad del

enzima hacia el sustrato u otro ligando. En el caso de los efectores alostéricos negativos (−) ocurre lo inverso. El centro alostérico donde se une el efector positivo se conoce como centro activador; el efector negativo se une a un centro inhibidor.

Los enzimas alostéricos se dividen en dos clases, en función de si la influencia del efector alostérico se produce sobre la K_m o sobre la $V_{máx}$. En la **clase K**, el efector altera la K_m pero no la $V_{máx}$, mientras que en la **clase V** el efector altera la $V_{máx}$ pero no la K_m. Los enzimas de la clase K dan gráficas de dobles recíprocos similares a las obtenidas con inhibidores competitivos (Figura 10.31) y los enzimas de la clase V dan gráficas de dobles recíprocos similares a las de los inhibidores no competitivos (Figura 10.32). No es adecuado utilizar los términos competitivo y no competitivo con sistemas enzimáticos alostéricos, ya que el mecanismo del efecto de un inhibidor alostérico sobre un enzima V o K es completamente diferente del mecanismo de un inhibidor competitivo o no competitivo sencillo. Por ejemplo, en la clase K la fijación de un efector negativo a un centro alostérico afecta la afinidad del centro de fijación de sustrato hacia el sustrato, mientras que en la inhibición competitiva sencilla el inhibidor compite directamente con el sustrato por el centro de fijación de sustrato. En los enzimas de la clase V, los modificadores alostéricos positivos y negativos incrementan o disminuyen la velocidad de descomposición del complejo ES en productos. La constante de velocidad catalítica, k_3, queda afectada mientras que no se modifica la constante de fijación de sustrato. Existen unos pocos enzimas en los que se afecten tanto la K_m como la $V_{máx}$.

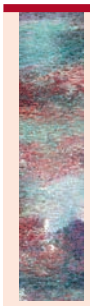
Teóricamente, un enzima monomérico puede experimentar una transición alostérica en respuesta a un ligando modulador. En la práctica, sólo se han encontrado dos enzimas alostéricos monoméricos, la ribunocleósido difosfato reductasa y la piruvato-UDP-*N*-acetilglucosamina transferasa. La mayoría de los enzimas alostéricos son **oligoméricos**, es decir, que constan de varias subunidades. Las subunidades idénticas se denominan **protómeros** y cada protómero consta de una o más cadenas polipeptídicas. Como consecuencia de la naturaleza oligomérica de los enzimas alostéricos, la fijación de ligando a un protómero puede afectar a la fijación de ligando sobre los otros protómeros del oligómero. Estos efectos de los ligandos se denominan **interacciones homotrópicas**. La transmisión de los efectos homotrópicos entre protómeros es un aspecto de la cooperatividad que se considera más adelante. Las influencias del sustrato sobre la fijación del sustrato, del activador sobre activador o del inhibidor sobre inhibidor son interacciones homotrópicas. Las interacciones homotrópicas son casi siempre positivas.

La **interacción heterotrópica** es el efecto de un ligando sobre la fijación de un ligando diferente. Por ejemplo, la influencia de un efector negativo sobre la fijación del sustrato o sobre la fijación de un activador alostérico son interacciones heterotrópicas. Las interacciones heterotrópicas pueden ser positivas o negativas, y pueden tener lugar en enzimas alostéricos monoméricos. En enzimas oligoméricos, tanto los efectos heterotrópicos como los homotrópicos están mediados por la cooperatividad entre subunidades.

En la Figura 10.38 se representan dos modelos basados en las descripciones anteriores sobre los enzimas alostéricos. En (*a*) se muestra un enzima monomérico, y en (*b*) se visualiza un modelo para un enzima oligomérico compuesto por dos protómeros. En ambos modelos pueden tener lugar interacciones heterotrópicas entre los centros del activador y del sustrato. En el modelo (*b*) pueden tener lugar interacciones homotrópicas entre los centros activadores o entre los centros del sustrato.

Los enzimas alostéricos presentan cinética sigmoidea

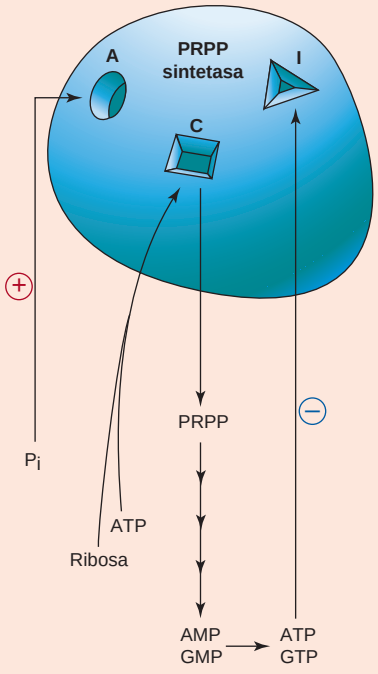
Como consecuencia de la interacción entre el centro del sustrato, el centro del activador y el centro del inhibidor, en la representación de [S] frente a v_0 de los enzimas alostéricos se obtiene una curva sigmoidea o en forma de **S** característica, según se muestra en la Figura 10.39 (curva A). Los efectores alostéricos negativos desplazan la curva hacia concentraciones de sustrato mayores, aumentando así la forma sigmoidea de la curva. Si empleamos como referencia $\frac{1}{2}V_{máx}$ puede apreciarse en la Figura 10.39 que se requiere una concentración de sustrato más elevada para conseguir $\frac{1}{2}V_{máx}$ en presencia de un efector negativo (curva C) que en su ausencia (curva A). En presencia de un modulador positivo (curva B), puede alcanzarse $\frac{1}{2}V_{máx}$ a una concentración de sustrato inferior a la requerida en ausencia del modulador positivo (curva A). Los moduladores positivos desplazan la gráfica de v_0 frente a [S] hacia las gráficas hiperbólicas observadas en la cinética de Michaelis–Menten.



APLICACIÓN CLÍNICA 10.6

Un caso de gota demuestra la diferencia entre un centro alostérico y el centro de fijación de sustrato

El hecho de que los centros inhibidores alostéricos estén separados de los centros activadores así como del de fijación de sustrato y del centro catalítico se ilustra mediante el estudio de un paciente de gota cuyos hematíes tenían niveles incrementados de PRPP (véase Apli. Clín. 10.1). Se encontró que la PRPP sintetasa del paciente tenía valores de K_m y $V_{máx}$ normales, y que era sensible a la activación por fosfato. Los mayores niveles de PRPP y la hiperuricemia surgían debido a que los productos finales de la ruta (ATP y GTP) no eran capaces de inhibir la sintetasa mediante el centro inhibidor alostérico (I). Se sugirió que una mutación en el centro inhibidor alostérico o en el mecanismo de acoplamiento entre el inhibidor y el centro catalítico conducía al fallo del mecanismo de control por retroacción.



Sperling, O., Persky-Brosh, S., Boen, P. y DeVries, A. Human erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate synthetase mutationally altered in regulatory properties. *Biochem. Med.* 7:389, 1973.

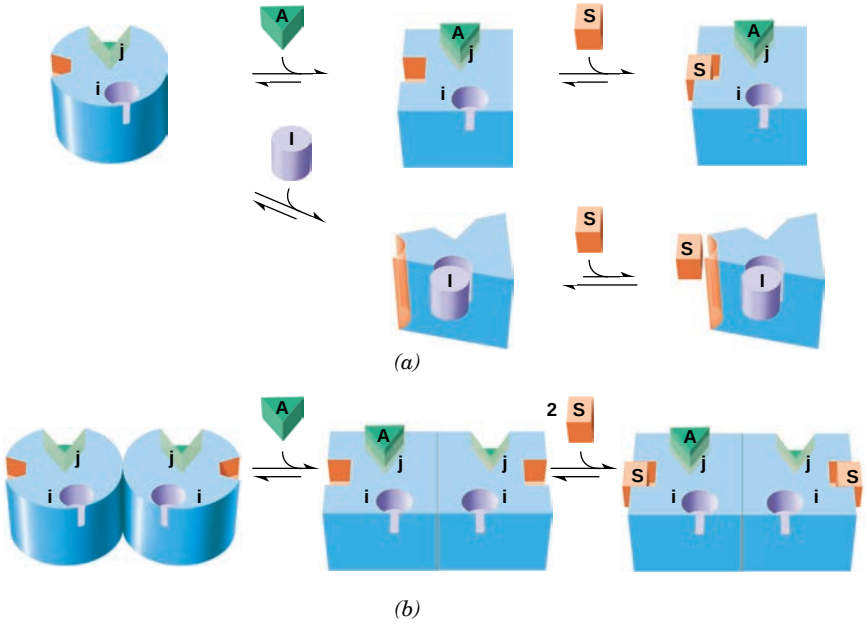


FIGURA 10.38
Modelos de sistemas enzimáticos alostéricos. (*a*) Modelo de un enzima monomérico. La unión de un efector alostérico positivo, A (en verde), al centro activador, j, induce una nueva conformación en el enzima con mayor afinidad hacia el sustrato. La unión de un efector alostérico negativo (en púrpura) al centro inhibidor, i, produce una conformación enzimática con una afinidad hacia el sustrato (en naranja) disminuida. (*b*) Modelo de un enzima alostérico polimérico. La unión del efector alostérico positivo A, al centro j produce un cambio alostérico en la conformación del protómero al que se ha unido el efector. Este cambio en la conformación se transmite al segundo protómero a través de interacciones cooperativas protómero–protómero. La afinidad del sustrato aumenta en ambos protómeros. Un efector negativo disminuye la afinidad por el sustrato de ambos protómeros.

La velocidad de los enzimas alostéricos puede controlarse de manera fina mediante pequeñas fluctuaciones en el nivel del sustrato; a menudo, la concentración del sustrato *in vivo* corresponde al segmento de subida abrupta en la gráfica sigmoidea de v_0 frente a [S]; en consecuencia, pequeños cambios en la concentración de sustrato dan lugar a grandes cambios de actividad enzimática (véase Figura 10.39). También es posible "desconectar el enzima" con pequeñas cantidades de un efector alostérico negativo, desplazando la K_m aparente a valores que están muy por encima del nivel *in vivo* del sustrato. Obsérvese que a una concentración dada de sustrato *in vivo* la velocidad inicial v_0 disminuye en presencia de un efector negativo (compárense las curvas A y C).

La cooperatividad explica la interacción entre los centros de unión de ligando en una proteína oligomérica

Dado que los enzimas alostéricos son habitualmente oligoméricos con gráficas sigmoideas de v_0 frente a [S], se propuso el concepto de cooperatividad para explicar la interacción entre centros de unión de ligando en enzimas oligoméricos. La **cooperatividad** se define como la influencia que tiene la fijación de un ligando a un protómero sobre la fijación del ligando a un segundo protómero de una proteína oligomérica. Debe recalcarse que otros mecanismos cinéticos distintos de la coope-

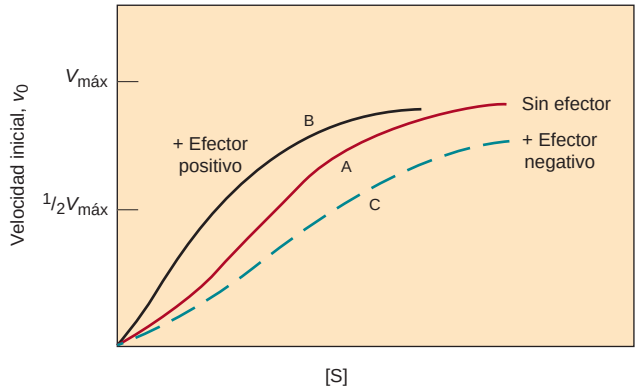


FIGURA 10.39
Perfil cinético de un enzima alostérico de la clase K. El enzima muestra curvas sigmoideas de v_0 frente a [S]. Los efectores negativos desplazan la curva hacia la derecha, dando así lugar a un incremento de K_m. Los efectores positivos desplazan la curva hacia la izquierda y dismininuyen efectivamente la K_m aparente. La $V_{máx}$ no cambia.

ratividad pueden dar lugar a gráficas sigmoideas de v_0 frente a [S]; en consecuencia, la forma sigmoidea no es diagnóstico de cooperatividad en una gráfica de v_0 frente a [S]. A menudo se ha confundido la relación entre alosterismo y cooperatividad. Los cambios conformacionales que tienen lugar en un protómero dado en respuesta a la fijación de ligando en un centro alostérico es un efecto alostérico. La cooperatividad implica generalmente un cambio de conformación de un protómero activado por efector, el cual a su vez transforma un protómero adyacente en una nueva conformación con una afinidad alterada hacia el ligando efector o hacia un segundo ligando. El cambio conformacional puede ser inducido por un efector alostérico o puede serlo por el sustrato, como sucede en el caso de la hemoglobina, en la que el centro de fijación de oxígeno de cada protómero corresponde al centro del sustrato y no a un centro alostérico. Por tanto, el cambio conformacional inducido por el oxígeno en los protómeros de hemoglobina no es técnicamente un efecto alostérico, aunque algunos autores lo identifiquen como tal. Es una interacción cooperativa homotrópica. Los que consideran los cambios inducidos por el oxígeno en la hemoglobina como "alostéricos" están utilizando el término en un sentido mucho más amplio que lo que permite la definición original; no obstante, actualmente muchos utilizan "alostérico" para describir cualquier cambio inducido por ligando en la estructura terciaria de un protómero.

Un efecto alostérico puede producirse en ausencia de cooperatividad. Por ejemplo, en la alcohol deshidrogenasa puede demostrarse la existencia de cambios conformacionales en cada uno de los protómeros por la adición de efectores alostéricos positivos. El centro activo de cada protómero es completamente independiente de los demás, y no existe cooperatividad entre los protómeros; es decir, que los cambios conformacionales inducidos en un protómero no se transmiten a los protómeros adyacentes.

Para describir matemáticamente las curvas de saturación de ligando observadas experimentalmente se han propuesto varios modelos de cooperatividad. Los dos modelos más prominentes son el concertado y el de encaje inducido secuencial. Aunque el modelo concertado es bastante restrictivo, la mayor parte de la nomenclatura asociada al alosterismo y cooperatividad surgió de este modelo. El **modelo concertado** propone que el enzima existe solamente en dos estados, el T (tenso) y el R (relajado) (Figura 10.40*a*). Los estados T y R están en equilibrio. Los activadores y sustratos favorecen el estado R y desplazan el equilibrio preexistente hacia el estado R, por la ley de acción de masas. Los inhibidores favorecen el estado T. Un cambio con-

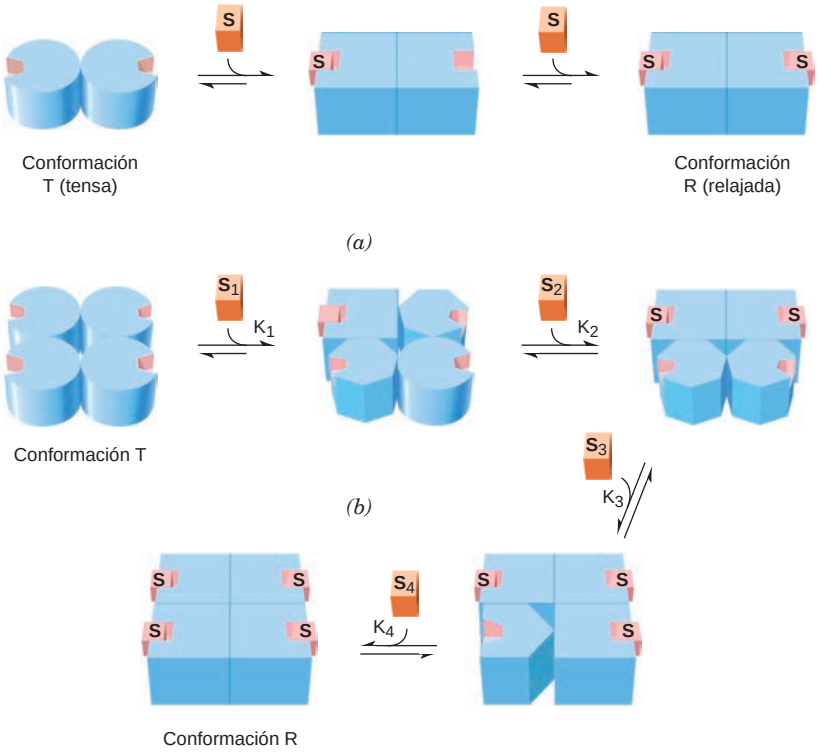


FIGURA 10.40
Modelos de cooperatividad.
(*a*) Modelo concertado. El enzima existe solamente en dos estados, el T (tenso) y el R (relajado). Los sustratos y activadores tienen una mayor afinidad por el estado R y los inhibidores por el estado T. Los ligandos desplazan el equilibrio entre los estados T y R. (*b*) Modelo encaje inducido secuencial. La unión de un ligando a cualquier subunidad induce un cambio conformacional en esa subunidad. Este cambio conformacional se transmite parcialmente a las subunidades adyacentes mediante interacciones subunidad–subunidad. Así, el efecto del primer ligando unido se transmite cooperativa y secuencialmente a las otras subunidades (protómeros) del oligómero, produciendo un incremento o descenso secuencial en la afinidad por el ligando en los otros protómeros. Según el ligando, la cooperatividad puede ser positiva o negativa.

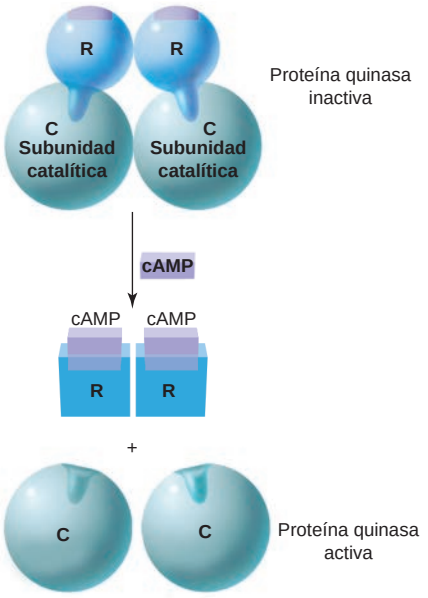


FIGURA 10.41
Modelo de enzima alostérico con subunidades catalíticas (C) y reguladoras (R) separadas. La subunidad reguladora de la proteína quinasa A contiene en su secuencia primaria una región que, al actuar como pseudosustrato, se une al centro de fijación del sustrato de la subunidad catalítica. En presencia de cAMP, la conformación de la subunidad R cambia, de modo que la región de pseudosustrato ya no puede fijarse, lo que da lugar a la liberación de las subunidades catalíticas C.

formacional en un protómero provoca un cambio correspondiente en todos los protómeros. No existen estados híbridos. Aunque explica el comportamiento cinético de muchos enzimas, este modelo no puede explicar la cooperatividad negativa.

El **modelo secuencial** propone que la fijación del ligando induce un cambio conformacional en un protómero. Se induce entonces parcialmente un cambio conformacional en un protómero adyacente contiguo al protómero que contiene el ligando fijado. El efecto de la fijación del ligando se transmite secuencialmente a través del oligómero, dando así lugar a una afinidad creciente o decreciente de los protómeros contiguos hacia el ligando (Figura 10.40*b*). En este modelo existen numerosos estados híbridos que dan lugar a la cooperatividad y a las gráficas sigmoideas de v_0 frente a [S]. Tanto la cooperatividad positiva como la negativa se pueden adaptar a este modelo. Un **modulador positivo** induce una conformación en el protómero que le confiere una mayor afinidad hacia el sustrato. Un **modulador negativo** induce una conformación diferente en el protómero con una menor afinidad hacia el sustrato. Ambos efectos se transmiten cooperativamente a los protómeros adyacentes. Para la clase de enzimas V, el efecto se produce sobre el proceso catalítico (k_3) en lugar de sobre K_m.

Las subunidades reguladoras modulan la actividad de las subunidades catalíticas

En la exposición precedente se ha considerado que el centro alostérico reside en el mismo protómero que el centro catalítico y que todos los protómeros son idénticos. En varios enzimas muy importantes existe una **subunidad reguladora** distinta. Estas subunidades reguladoras no tienen actividad catalítica, pero su unión con el protómero catalítico modula la actividad de la subunidad catalítica mediante un cambio conformacional inducido. En la Figura 10.41 se muestra un esquema de estrategia de regulación mediante subunidades reguladoras para el complejo de la **proteína quinasa A** (PKA). Cada subunidad reguladora (R) tiene un segmento de su secuencia primaria que es un pseudosustrato para la subunidad catalítica (C). En ausencia de cAMP, la subunidad R se une al centro activo de la subunidad C a través de la secuencia de pseudosustrato, inhibiendo así la actividad de la proteína quinasa. Cuando los niveles celulares de cAMP aumentan, éste se fija a un centro de las subunidades R, lo que provoca un cambio conformacional. Este cambio elimina la secuencia de pseudosustrato del centro activo de la subunidad C. Las subunidades C se liberan y pueden entonces aceptar otros sustratos proteicos que contengan la secuencia de pseudosustrato.

La **calmodulina** (véase p. 525), proteína de 17 kDa que fija Ca^{2+}, es una subunidad reguladora de enzimas que utilizan Ca^{2+} como modulador de su actividad. La unión del calcio a la calmodulina induce un cambio conformacional en la calmodulina que le permite unirse al enzima dependiente de Ca^{2+}. Esta unión induce, a su vez, un cambio conformacional en el enzima que le permite recuperar su actividad.

10.7 | ESPECIFICIDAD ENZIMÁTICA: EL CENTRO ACTIVO

Los enzimas son los catalizadores más específicos que se conocen, tanto desde el punto de vista del sustrato como del tipo de reacción llevado a cabo sobre el sustrato. La especificidad reside en el **centro de fijación del sustrato**, que se encuentra sobre la superficie del enzima. La estructura terciaria del enzima está plegada de tal manera que se crea una región con las dimensiones moleculares correctas, la topología adecuada y el alineamiento óptimo de grupos contraiónicos y regiones hidrofóbicas para acomodar un sustrato específico. Las tolerancias en el centro activo son tan pequeñas que usualmente sólo puede fijarse en él un isómero de un par diastereomérico. Por ejemplo, la D-aminoácido oxidasa sólo fija D-aminoácidos y no L-aminoácidos. Algunos enzimas muestran una especificidad absoluta hacia el sustrato. Otros tienen una especificidad más amplia y aceptan varios análogos diferentes de un sustrato específico. Por ejemplo, la hexoquinasa cataliza la fosforilación de glucosa, manosa, fructosa, glucosamina y 2-desoxiglucosa, aunque no a la misma velocidad. La glucoquinasa, por otra parte, es específica de la glucosa.

La especificidad de la reacción catalizada reside en el centro activo y en los aminoácidos que participan en la fase de la catálisis de formación o rotura de enlaces (véase p. 443).

La complementariedad entre el sustrato y el enzima explica la especificidad de sustrato

Se han propuesto varios modelos para explicar la especificidad de sustrato de los enzimas. La primera propuesta fue el **modelo de la "llave y la cerradura"** (Figura 10.42), que considera que en la superficie enzimática existe una impresión negativa del sustrato. El sustrato encaja en su centro de fijación de la misma manera que una llave entra en la cerradura adecuada o una mano en el guante adecuado. Los enlaces iónicos y por puentes de hidrógeno, así como las interacciones hidrofóbicas, contribuyen a la unión del sustrato al centro de fijación. Este modelo da una visión rígida del enzima y no puede explicar el efecto de ligandos alostéricos.

Un modelo más flexible del centro de fijación es el modelo del **acoplamiento** o **encaje inducido** (*induced fit*), en el que el centro de fijación y el centro activo no están completamente preformados. Los elementos esenciales del centro de fijación están presentes en la medida en que el sustrato correcto pueda colocarse adecuadamente en el centro de fijación. La interacción del sustrato con el enzima induce un cambio conformacional en el enzima que tiene como resultado la formación de un centro de fijación más fuerte y la redisposición de los aminoácidos adecuados para formar el centro activo. En la Figura 10.43*a* se muestra un diagrama del modelo del acoplamiento inducido. La Figura 10.44 muestra un ejemplo específico de encaje inducido: el cambio conformacional inducido por la glucosa sobre la hexoquinasa que da lugar a la formación del sitio catalítico. El lóbulo menor de la hexoquinasa, en verde, gira y se desplaza unos 12 Å para cerrarse alrededor de la glucosa haciendo que los residuos del sitio activo queden próximos al sustrato glucosa. Se observa un cambio muy pequeño en el lóbulo mayor (en azul).

El encaje inducido combinado con la tensión sobre el sustrato explica un mayor número de observaciones experimentales sobre la acción de los enzimas que los otros modelos. En este modelo (Figura 10.43*b*), el sustrato es "tensionado" hacia la formación de producto como resultado de una transición conformacional inducida en el enzima. Un buen ejemplo de **tensión del sustrato** inducida por el enzima se observa en la lisozima (Figura 10.45) en donde la conformación del residuo glucídico "D" en el que tiene lugar la rotura del enlace está tensionada, adoptando, cuando se fija al enzima, la conformación de semisilla inestable en lugar de silla estable. En la Figura 10.46 se muestran estas conformaciones de la glucosa. El concepto de tensión sobre el sustrato es útil para explicar el papel del enzima en el incremento de la velocidad de las reacciones (véase p. 445).

Asimetría del centro de fijación

Los enzimas no sólo son capaces de distinguir entre isómeros del sustrato, sino que también son capaces de distinguir entre dos átomos equivalentes en una molécula

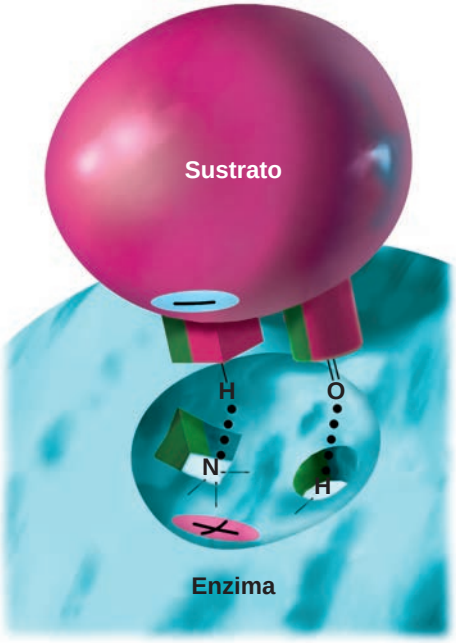


FIGURA 10.42
Modelo de la llave y cerradura del centro de fijación del sustrato.
El enzima contiene una impresión negativa de las características moleculares del sustrato, permitiendo así la especificidad del enzima por un sustrato determinado. La formación de pares iónicos específicos puede contribuir al reconocimiento del sustrato.

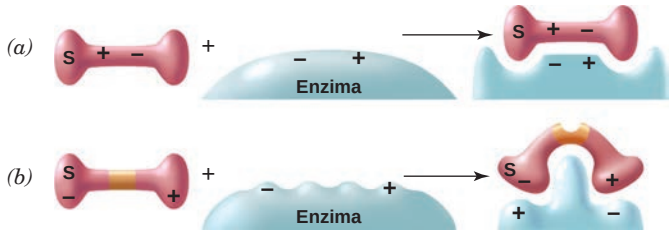


FIGURA 10.43
Modelos de encaje inducido y de tensión sobre el sustrato.
(*a*) La aproximación del sustrato al enzima induce la formación del centro activo. (*b*) La tensión sobre el sustrato inducida por la unión del sustrato al enzima deforma los ángulos de enlace y "activa" el sustrato.
Reproducido con permiso de Koshland, D. Annu. Rev. Biochem. *37:374, 1968. Copyright © 1968 by Annual Reviews, Inc.*

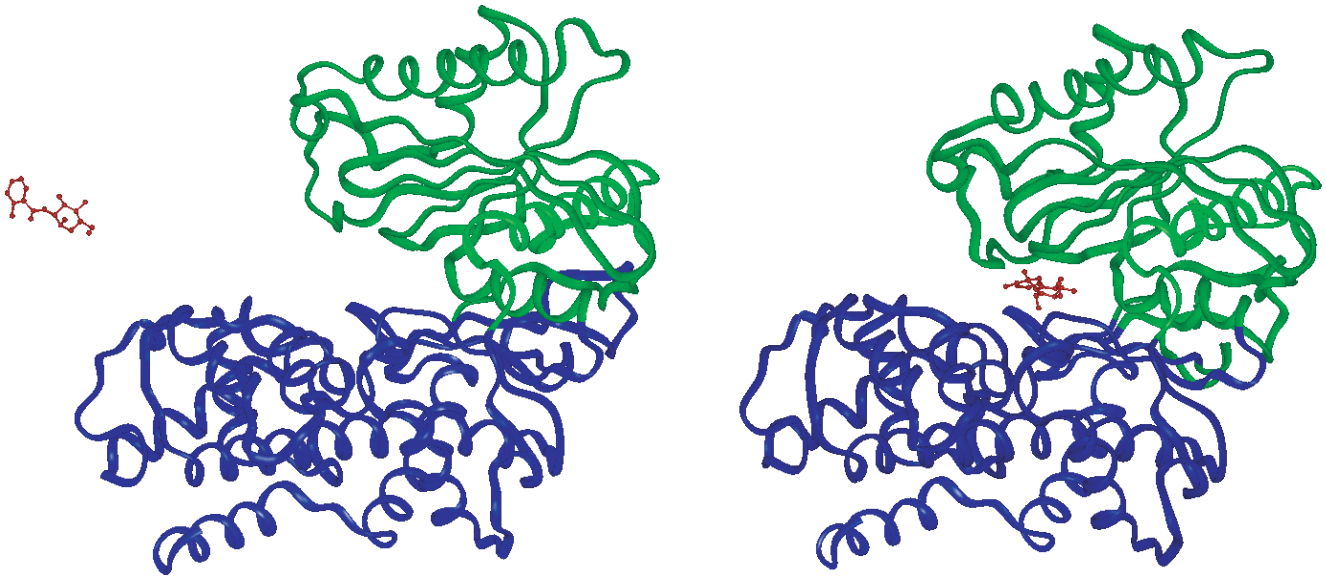


FIGURA 10.44
Cambios conformacionales de la hexoquinasa inducidos por la glucosa.
(*a*) Hexoquinasa sin glucosa. (*b*) Hexoquinasa con glucosa. La cinta de triple cuerda traza el esqueleto peptídico de la hexoquinasa. *Dibujado a partir de los ficheros PDB 1HKG y 2YHX; Bennett, W. S. Jr. y Steitz, T. A.* J. Mol. Biol. *140:211, 1980.*

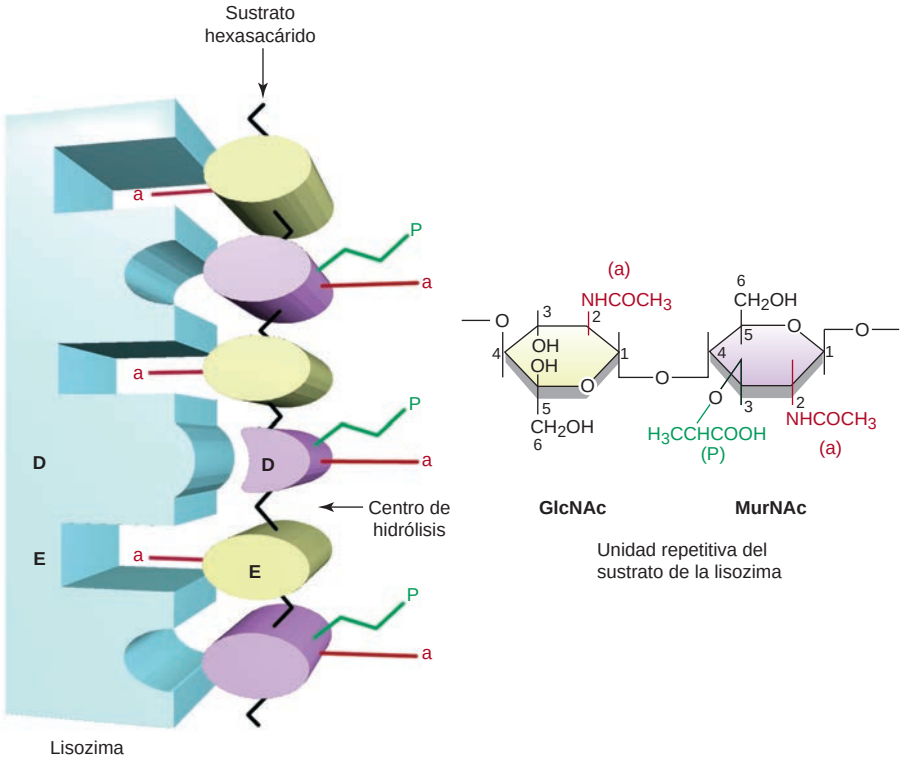


FIGURA 10.45
Unión de un hexasacárido al centro activo de la lisozima.
En el sustrato modelo representado, los óvalos representan los anillos de piranosa de las unidades repetidas del sustrato de la lisozima, que se muestra a la derecha de la figura. El anillo D, forzado por el enzima, adopta la conformación de semisilla, teniendo así lugar la hidrólisis entre los anillos D y E. El sustrato es fijado por seis subcentros del enzima. Existen centros alternativos específicos para grupos acetamido (a) pero que son incapaces de aceptar las cadenas laterales de lactilo (P) que aparecen en los residuos de ácido *N*-acetilmurámico. Así, el sustrato sólo se puede fijar al enzima en una orientación.
Adaptado de un modelo propuesto por T. Imoto, et al. En: P. Boyer (Ed.), The Enzymes, *3rd ed., Vol. 7. New York: Academic Press, 1972, p. 713.*

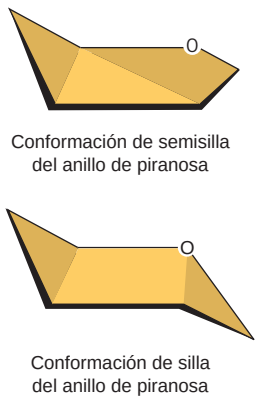
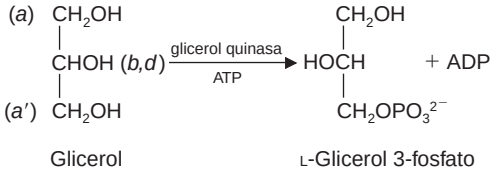


FIGURA 10.46
Dos conformaciones posibles de la glucosa.

simétrica. Por ejemplo, el enzima glicerol quinasa es capaz de distinguir entre configuraciones de H y OH sobre el carbono-2 en el sustrato simétrico glicerol, lo que hace que sólo se forme el producto asimétrico L-glicerol 3-fosfato. Estos sustratos proquirales tienen dos sustituyentes idénticos y dos grupos adicionales disímiles en el mismo carbono ($C_{aa'bd}$).



Los sustratos proquirales no poseen actividad óptica, pero se pueden convertir en compuestos quirales, es decir, que poseen un centro asimétrico. La explicación de este enigma queda patente si el enzima fija los dos grupos disímiles en sitios específicos y sólo uno de los dos sustituyentes similares puede fijarse en el sitio activo (Figura 10.47). De este modo, el enzima sólo es capaz de reconocer una configuración específica de la molécula simétrica. Se induce asimetría en el producto por modificación de un lado del sustrato fijado. Se requiere un mínimo de tres puntos diferentes de fijación en la superficie del enzima para distinguir entre grupos idénticos de un sustrato proquiral.

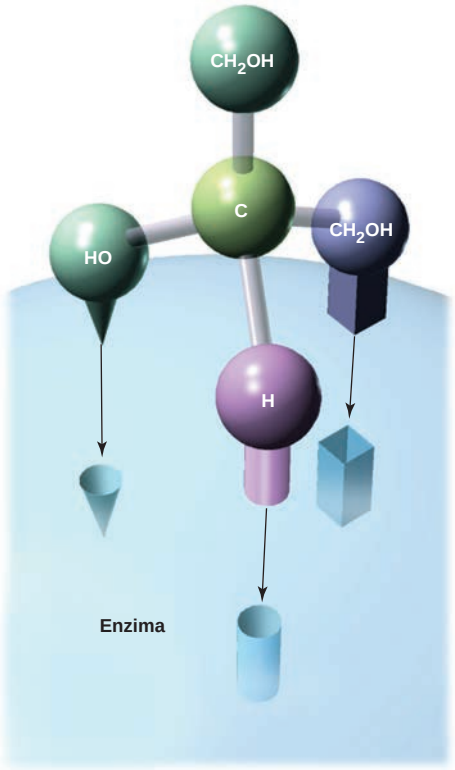
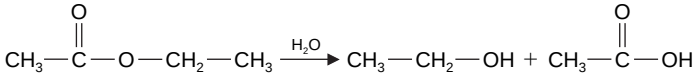


FIGURA 10.47
Anclaje por tres puntos de un sustrato simétrico a un sitio de fijación de sustrato asimétrico.
La glicerol quinasa, gracias a que posee centros de fijación diferentes para los grupos —H y —OH del glicerol, sólo fija el grupo hidroximetilo α' en el centro activo. Así sólo se produce un estereoisómero en la reacción de la quinasa: el L-glicerol 3-fosfato.

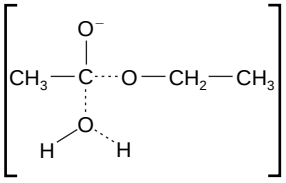
10.8 MECANISMO DE CATÁLISIS

Todas las reacciones químicas han de superar una barrera de energía potencial para que los reactivos se transformen en productos. En la fase gaseosa las moléculas reactivas pueden obtener la suficiente energía cinética mediante calentamiento para que las colisiones den lugar a la formación de producto. Lo mismo sucede en las soluciones. Sin embargo, una temperatura corporal bien controlada de 37°C no permite que se incremente la temperatura para acelerar la reacción, y 37°C no es una temperatura suficientemente elevada para proporcionar las velocidades de reacción requeridas por los animales de movimiento rápido. Los enzimas emplean otros medios para superar la barrera a la reacción.

En la Figura 10.48 se muestra una comparación de los diagramas de reacciones catalizadas y sin catalizar. La barrera de energía presentada por la curva sin catalizar de la Figura 10.48 es una medida de la **energía de activación**, E_a, requerida para que se produzca la reacción. La coordenada de reacción es simplemente la ruta en términos de extensión del enlace entre reactivos y productos. En el vértice de la barrera energética se encuentra el complejo activado conocido como **estado de transición**, Ts, que representa a los reactivos en su estado activado. En este estado, los reactivos se encuentran en una etapa intermedia en el camino de reacción, y no se pueden identificar ni como materiales de partida ni como productos. Por ejemplo, en la hidrólisis del etil acetato:



el Ts se podría parecer a



El complejo del estado de transición puede descomponerse en productos o volver a los reactivos. ¡El Ts no es un intermedio y no puede aislarse! En el caso de la reacción catalizada por enzima (Figura 10.48), la energía de los reactivos y de los productos no es diferente de la de la reacción sin catalizar. Los enzimas no cambian la termodinámica del sistema, sino el camino para alcanzar el estado final.

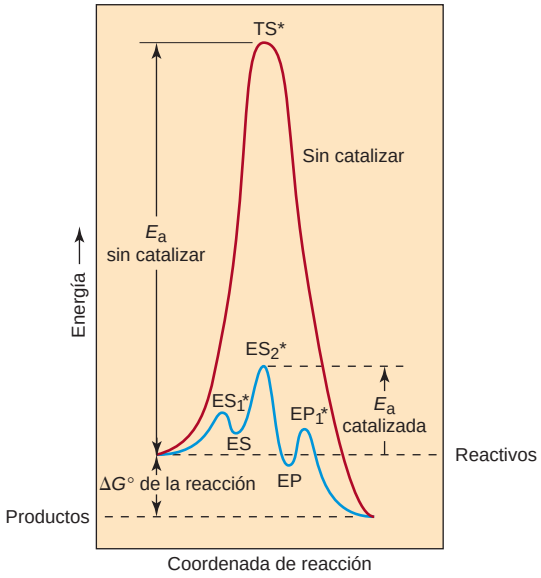


FIGURA 10.48
Diagrama de energía para reacciones catalizadas frente a no catalizadas.
La diferencia de energía global entre los reactivos y los productos es la misma en las reacciones catalizada y no catalizada. La reacción catalizada por enzima tiene lugar a una velocidad más elevada porque disminuye la energía de activación.

Tal como queda patente en el diagrama energético, pueden existir diversos picos o valles en el perfil energético de una reacción enzimática. En estos puntos existen intermedios metastables. Es importante notar que cada valle se puede alcanzar con el suministro calórico asequible en un sistema a 37°C. El enzima permite que se escale la barrera energética a pasos. El complejo ES de Michaelis–Menten no es el estado de transición, si bien se puede encontrar en uno de los valles ya que en el complejo ES los sustratos están orientados adecuadamente y el sustrato puede así estar "tensionado". Los enlaces a romper se encuentran más adelante en la coordenada de reacción.

Si nuestros conceptos sobre el estado de transición son correctos, se podría esperar que los compuestos diseñados para parecerse al estado de transición se fijaran al enzima mucho más fuertemente que el sustrato natural. Se ha demostrado que esto es así. En tales análogos del sustrato se encuentran afinidades 10^2 a 10^5 veces superiores a la afinidad del sustrato. Estos compuestos se denominan **análogos del estado de transición**, y son potentes inhibidores enzimáticos. Anteriormente, se trató la acción de la lisozima en función de la tensión sobre el sustrato y se mencionó la conversión del anillo glucídico D desde la conformación de silla a una conformación tensionada de semisilla. La síntesis de un análogo del estado de transición en forma de δ-lactona de la tetra-*N*-acetil-quitotetrosa (Figura 10.49), que tiene una conformación distorsionada de semisilla, seguida por estudios de fijación, mostraron que este análogo del estado de transición se fijaba 6000 veces mejor que el sustrato normal.

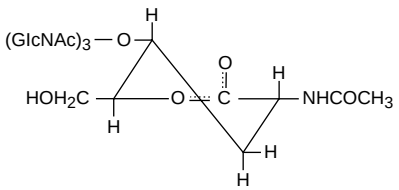


FIGURA 10.49
Un análogo del estado de transición del anillo D del sustrato de la lisozima (tetra *N*-acetil-quitotetrosa-γ-lactona).

Los enzimas disminuyen la energía de activación

Por término medio, los enzimas son capaces de incrementar las velocidades de reacción en un factor de 10^9 a 10^{12} veces la de la reacción sin catalizar. La orotidina 5′-fosfato descarboxilasa es el enzima más eficiente conocido con un incremento de la velocidad de 10^{17}. En general, el incremento de velocidad se puede explicar mediante los siguientes mecanismos: catálisis ácido–básica, tensión sobre el sustrato (estabilización del estado de transición), catálisis covalente, desestabilización del estado basal y efectos entrópicos. Un enzima concreto puede utilizar uno o más de estos mecanismos para conseguir los fantásticos incrementos de velocidad observados.

Catálisis ácido–básica

En la mayoría de las reacciones enzimáticas no se encuentran protones e iones hidroxilo libres, y cuando se encuentran es sólo en algunos enzimas dependientes de

metales (véase p. 429). Un **ácido** o **base general** es un compuesto débilmente ionizable. En el intervalo fisiológico del pH, la forma protonada de la histidina es el ácido general más importante, y su base conjugada es una importante base general (Figura 10.50). Otros ácidos son el tiol —SH de la cisteína, el —OH de la tirosina y el grupo **ε**-amino de la lisina. Otras bases son los aniones de los ácidos carboxílicos y las bases conjugadas de los ácidos generales.

La ribonucleasa (RNasa) es un buen ejemplo del papel de la catálisis ácida y básica en el centro activo del enzima. La RNasa rompe la cadena de RNA en el enlace 3′-fosfodiéster de nucleótidos pirimidínicos con la formación obligatoria del intermedio pirimidina 2′,3′–fosfato cíclico. En el mecanismo esbozado en la Figura 10.51, la His-119 actúa como un ácido general para protonar el enlace fosfodiéster, mientras que la His-12 actúa como una base generando un alcóxido sobre el hidroxilo 3′ de la ribosa. Este último ataca entonces al fósforo, dando así lugar a la formación del fosfato cíclico y a la rotura de la cadena de RNA en este lugar. El fosfato cíclico se rompe entonces en la fase 2 mediante la inversión de las reacciones de la fase 1, pero aquí el agua reemplaza al grupo saliente. Las histidinas del centro activo revierten a su estado de protonación original.

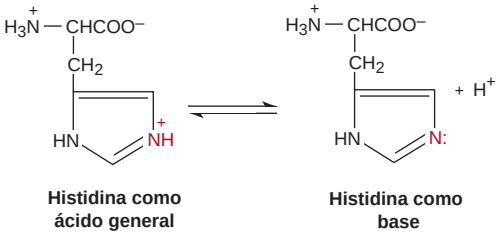


FIGURA 10.50
Formas ácida y básica de la histidina.

Tensión sobre el sustrato

Nuestra exposición anterior sobre este tema estaba relacionada con el encaje inducido de los enzimas por el sustrato. La fijación del sustrato a un centro preformado del enzima puede inducir tensión en el sustrato. Independientemente del mecanismo de inducción de la tensión, el nivel energético del sustrato aumenta, y los ángulos y longitud de los enlaces del sustrato son más parecidos a los que se encuentran en el estado de transición.

En el mecanismo de acción de la lisozima se encuentran una combinación de tensión sobre el sustrato y de catálisis ácido–básica (Figura 10.52). Los datos de rayos X muestran que al fijarse el sustrato hexasacárido al enzima se ejerce tensión sobre el anillo D, que pasa a la conformación de semisilla. La catálisis ácida general mediante el ácido glutámico del centro activo hace que la semisilla inestable pase

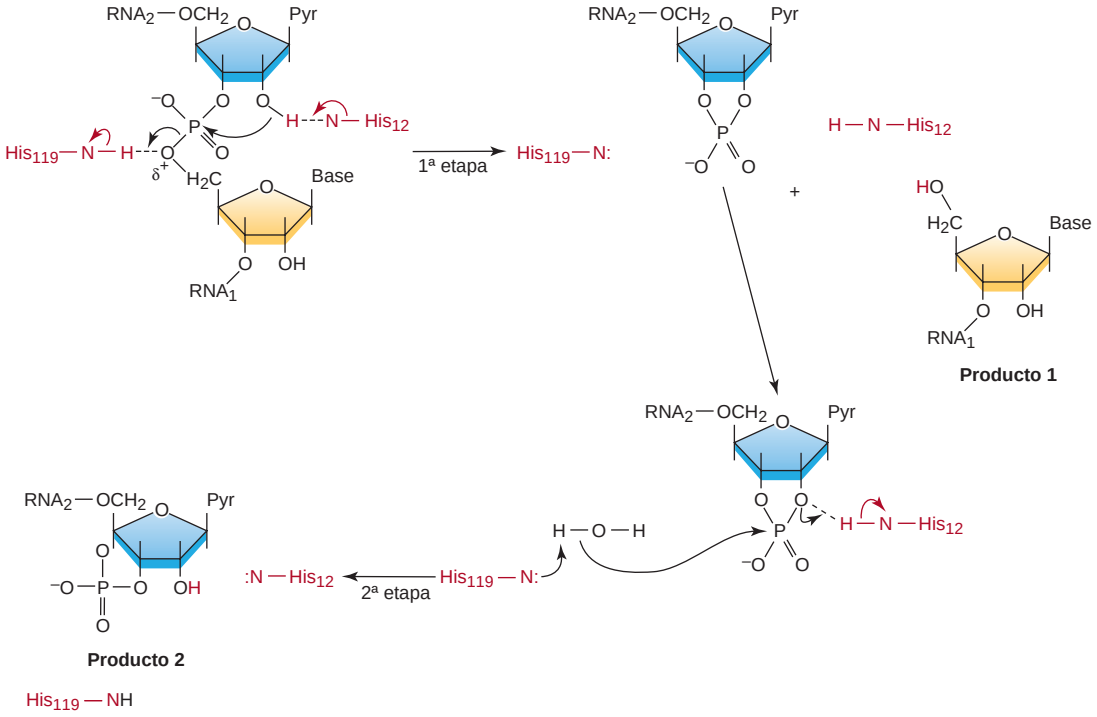


FIGURA 10.51
Papel de la catálisis ácida y básica en el centro activo de la ribonucleasa.
La RNasa rompe el enlace fosfodiéster en sitios pirimidínicos del RNA. Los residuos de His 12 y 119 del centro activo de la ribonucleasa funcionan, respectivamente, como catalizadores básico y ácido facilitando la formación del intermedio 2′,3′-fosfato cíclico y liberando un fragmento de RNA más corto (producto 1). Estas mismas histidinas juegan un papel inverso en la hidrólisis del fosfato cíclico y en la liberación del otro fragmento del RNA (producto 2), que finaliza con pirimidina 3′-fosfato. Como consecuencia de la formación del producto 2 se regenera el centro activo del enzima.

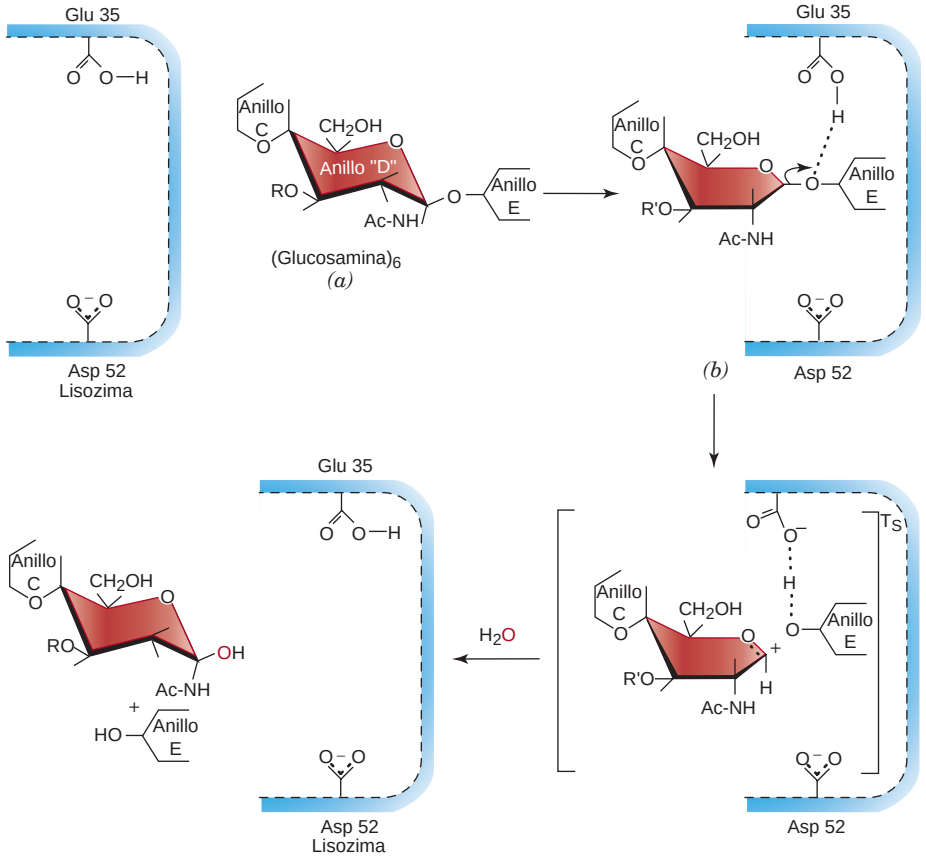


FIGURA 10.52
Mecanismo de acción de la lisozima: tensión sobre el sustrato.
La unión de la conformación estable de silla (*a*) del sustrato al enzima genera la conformación tensionada de semisilla (*b*) en el complejo ES. En el estado de transición, la hidrólisis catalizada por ácido del enlace glucosídico mediante un residuo de ácido glutámico del centro activo genera un ion carbonio sobre el anillo D, que libera la tensión generada en el complejo ES inicial y provoca el colapso del estado de transición hacia productos.

al estado de transición. El ion oxicarbonio que se forma en el estado de transición se estabiliza mediante un aspartato cargado negativamente. La rotura del enlace glucosídico entre los anillos D y E aligera el estado de transición tensionado, permitiendo que el anillo D vuelva a la conformación estable de silla.

Catálisis covalente

En la **catálisis covalente**, el ataque de un grupo nucleofílico (cargado negativamente) o electrofílico (cargado positivamente) del centro activo del enzima sobre el sustrato conduce a la unión covalente del sustrato al enzima como intermedio en la secuencia de reacción. Algunos coenzimas unidos al enzima forman a menudo enlaces covalentes con el sustrato. Por ejemplo, en las transaminasas el aminoácido sustrato forma una base de Schiff con el piridoxal fosfato unido al enzima (véase p. 783). En todos los casos de catálisis covalente, el sustrato unido al enzima o al coenzima es más lábil que el sustrato original. El compuesto enzima–sustrato representa una de las depresiones en el perfil energético (Figura 10.48).

Las serina proteasas tales como la tripsina, quimotripsina y trombina son buenos representantes del mecanismo catalítico covalente (véase p. 377). En el caso de la quimotripsina se ha aislado el enzima acilado. En estos enzimas concretos, la catálisis covalente está asistida por catálisis ácido–básica (Figura 10.53). En la quimotripsina el nucleófilo atacante es la Ser 195, que no está disociada a pH 7,4, por lo que se precisa un mecanismo para ionizar este grupo fuertemente básico. Actualmente se supone que, en el entorno anhidro del centro activo, la Ser 195 y la His 57 tienen valores de pK similares y que la carga negativa del Asp 102 estabiliza la transferencia del protón desde el OH de la Ser 195 al N3 de la His 57 (Figura 10.53). El alcóxido de la serina resultante ataca al carbono carbonílico del enlace

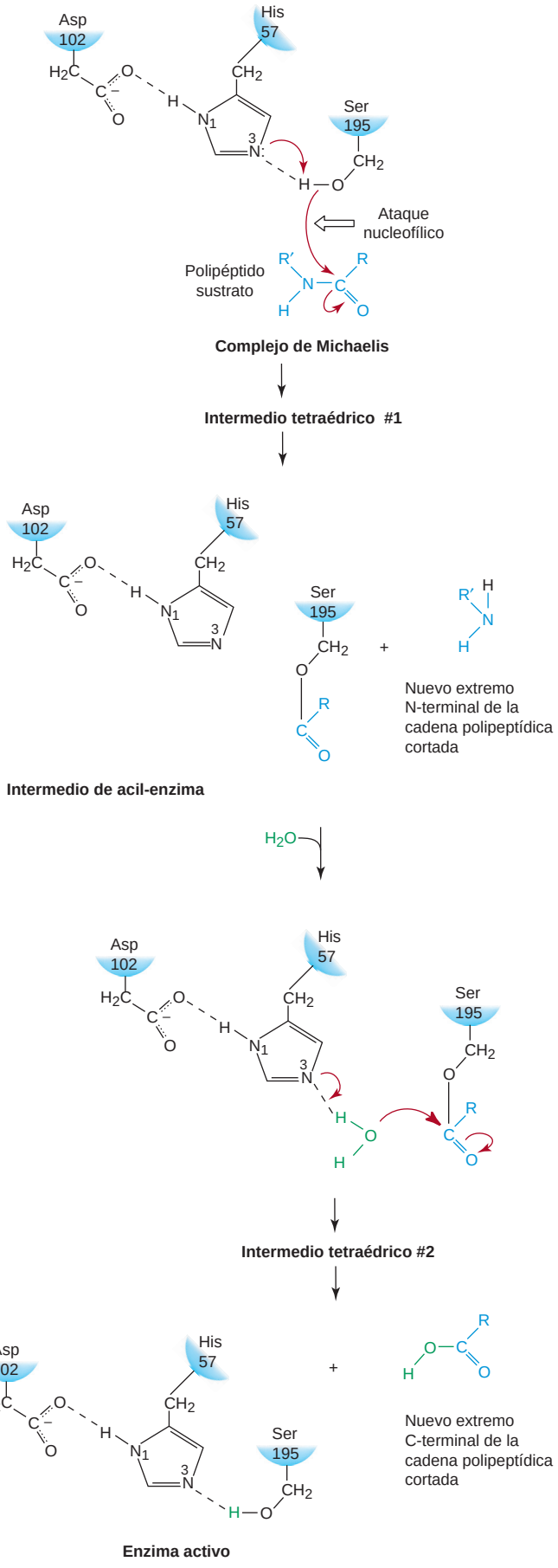


FIGURA 10.53
Catálisis covalente en el centro activo de la quimotripsina. Mediante el ataque nucleofílico catalizado por ácido, indicado por las flechas en rojo, el enlace amida estable del sustrato peptídico se convierte en un enzima acilado inestable a través de la serina-195 del enzima. Este último se hidroliza en el paso determinante de velocidad. El nuevo péptido amino terminal, mostrado en azul, se libera concomitantemente con la formación del enzima acilado.

peptídico, libera el extremo aminoterminal de la proteína y forma el **intermedio de enzima acilado** (en la Ser 195). El enzima acilado se escinde por reversión de la secuencia de reacción, pero en este caso actúa como nucleófilo el agua en lugar de la Ser 195. Las pruebas químicas indican la formación de dos intermedios tetraédricos, uno anterior a la formación del enzima acilado y el otro posterior al ataque del agua sobre el acil-enzima (Figura 10.54).

Estabilización del estado de transición

Los efectos mencionados anteriormente promueven la entrada del sustrato en el estado de transición. Dado que el centro activo fija el estado de transición con una

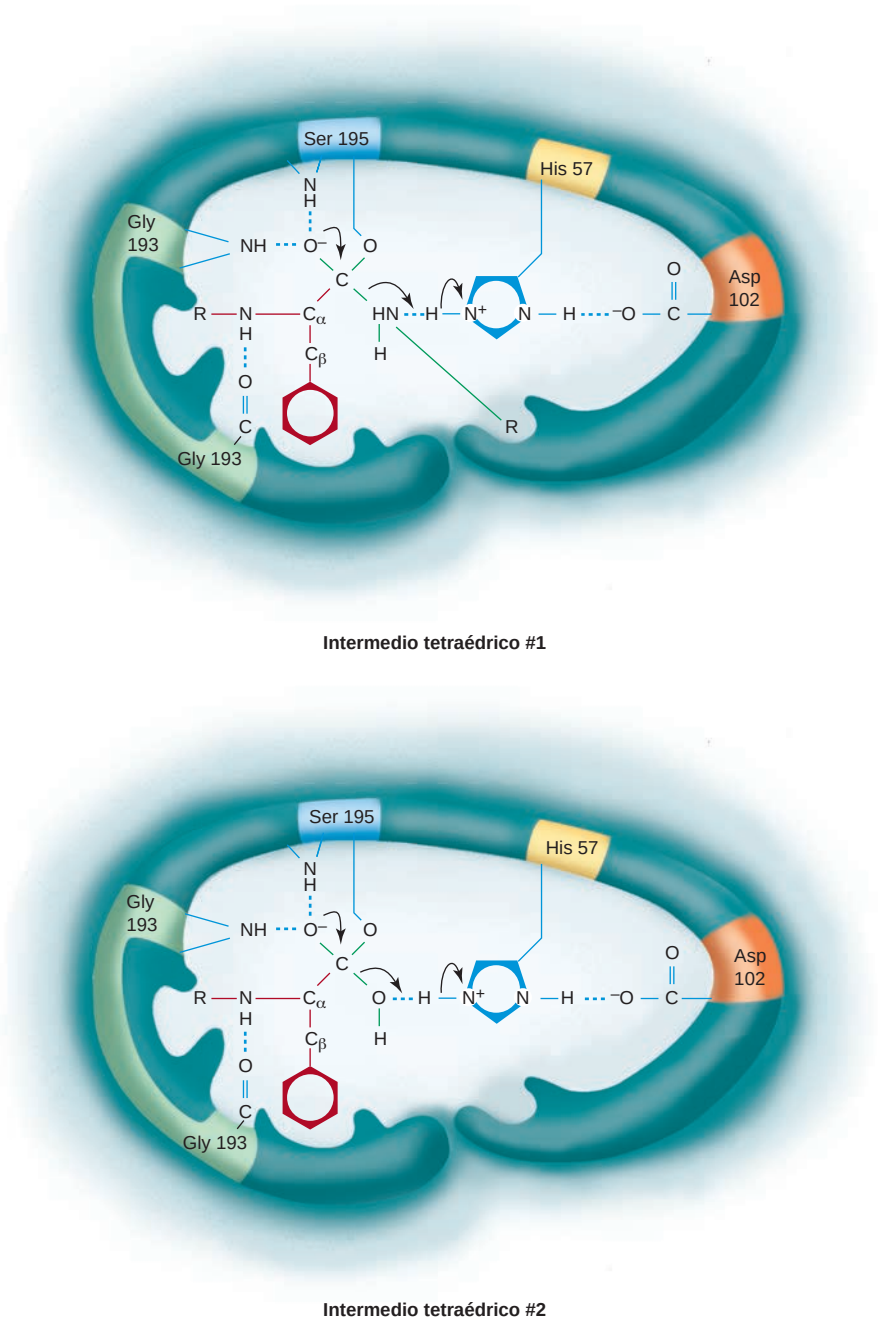


FIGURA 10.54
Intermedios tetraédricos.
(*a*) Modelo de intermedio tetraédrico #1 que precede a la formación del intermedio de acil-enzima. (*b*) Modelo de intermedio tetraédrico #2 resultante del ataque del agua sobre el intermedio de acil-enzima.

mayor afinidad que el sustrato, la pequeña fracción de moléculas de sustrato que existe con la geometría del estado de transición será convertida rápidamente en producto. De este modo, por acción de masas, todo el sustrato puede ser convertido rápidamente en producto. Cualquier factor que incremente la población de moléculas de sustrato que se asemeja al estado de transición contribuirá a la catálisis.

Efectos entrópicos

La **entropía** es un término termodinámico, ΔS, que define el grado de desorden de un sistema. En el equilibrio, la entropía es máxima. Por ejemplo, dos reactivos A y B en solución existen en muchas orientaciones diferentes. Las posibilidades de que A y B se unan con la orientación geométrica correcta y con suficiente energía para reaccionar es pequeña a 37°C y en solución diluida. Sin embargo, si un enzima con dos centros de fijación de alta afinidad para A y B se introduce en la solución diluida de estos reactivos, tal como se sugiere en la Figura 10.55, A y B se unirán al enzima con la orientación correcta para que tenga lugar la reacción. Se fijarán con la estequiometría correcta, y la concentración efectiva de los reactivos se incrementará sobre la superficie enzimática, todo lo cual contribuirá a incrementar la velocidad de reacción.

Una vez situados correctamente sobre la superficie enzimática, y como resultado de la fijación, los sustratos pueden ser "tensionados" hacia el estado de transición. En este punto, los sustratos quedan "preparados" para la catálisis ácido–básica y/o covalente. La orientación adecuada y la proximidad del sustrato respecto a los grupos catalíticos, lo que se ha llamado "**efecto de proximidad**", contribuye de 10^3 a 10^5 veces en el incremento de velocidad observado con los enzimas. Se ha calculado que la disminución de entropía contribuye con un factor de 10^3 al incremento de velocidad.

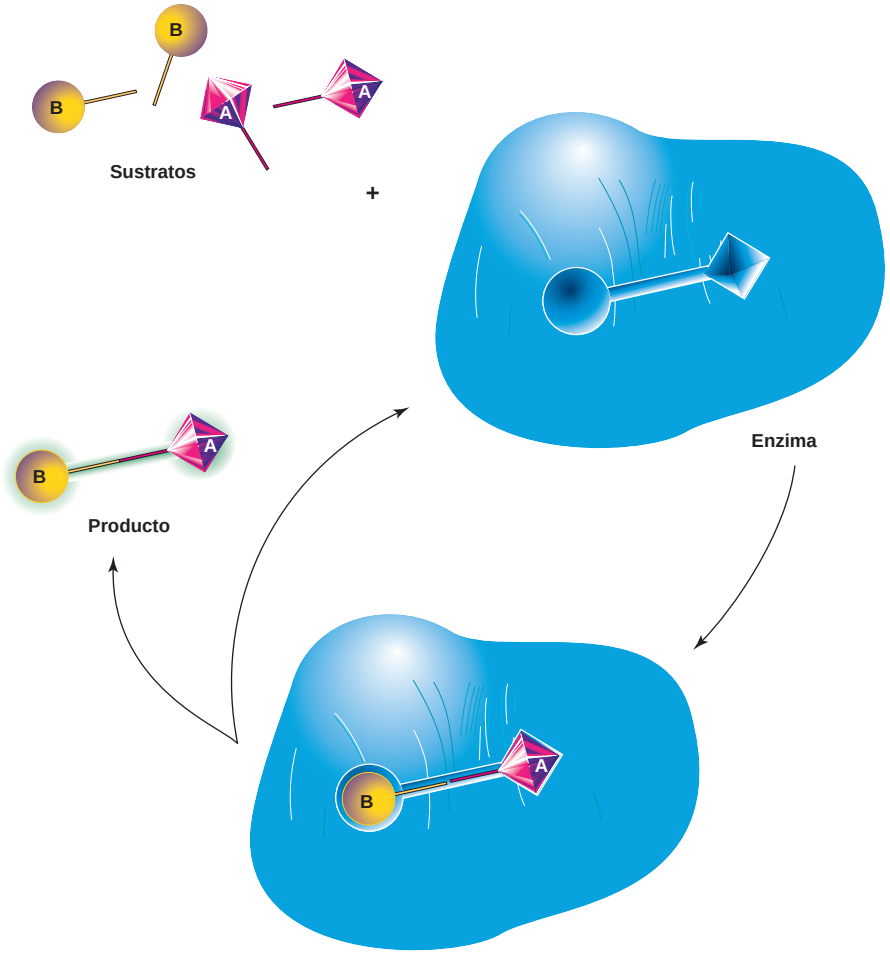


FIGURA 10.55
Papel del enzima en el incremento de la velocidad de reacción por disminución de la entropía.
Los sustratos en solución diluida se concentran y orientan sobre la superficie enzimática de manera que se incrementa la velocidad de reacción.

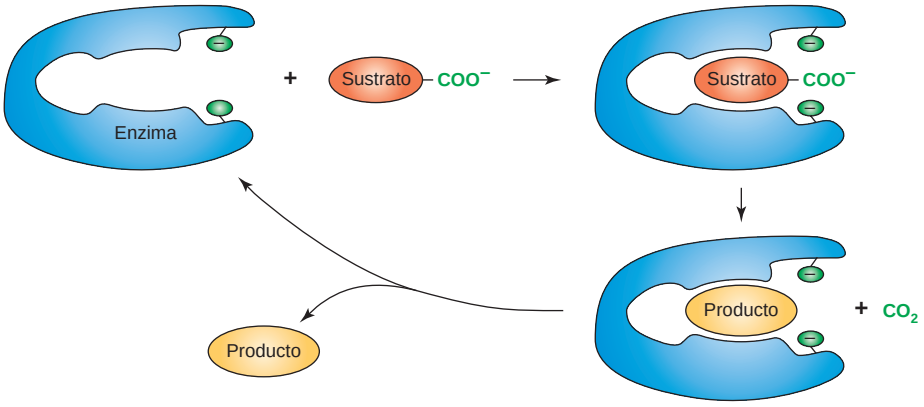
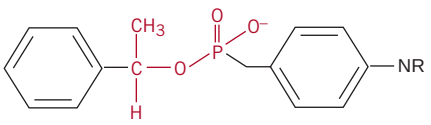


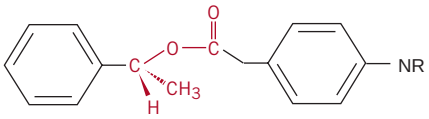
FIGURA 10.56
Modelo del papel del enzima en el aumento de la energía del estado basal del complejo ES.
Esta desestabilización del estado basal provoca una disminución de la energía de activación. La repulsión carga-carga, estado basal desestabilizado, que se desarrolla al fijarse el sustrato se aligera por descarboxilación del sustrato.

Desestabilización del estado basal

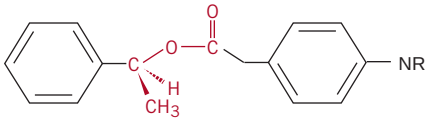
Además de la disminución de E_a por los mecanismos que acabamos de exponer, también se puede disminuir la barrera de energía aumentando la energía del **estado basal**. Los enzimas pueden lograr esta desestabilización del estado basal seleccionando conformaciones de sustratos y residuos del sitio activo que se acercan a las distancias de enlace y ángulos que se encuentran en el estado de transición. La formación de estos confórmeros próximos al ataque está impulsada por la entalpía. También se puede desestabilizar el estado basal poniendo en contacto cargas del mismo signo pertenecientes a enzima y sustrato por lo que la alteración química aligerará la energética desfavorable, tal como se sugiere en la Figura 10.56 en donde la liberación del grupo carboxilo en forma de CO_2 libera la interacción de cargas desfavorable del sustrato y enzima.



(a) Análogo del estado de transición



(b) Isómero (*R*) del sustrato



(c) Isómero (*S*) del sustrato

FIGURA 10.57
Hapteno y sustrato para un anticuerpo catalítico (abzima).
El fosfonato (*a*) es el análogo del estado de transición que se utilizó como hapteno para producir anticuerpos con una actividad catalítica de tipo lipasa. Se pueden obtener abzimas específicos para el isómero (*R*), en (*b*); o para el isómero (*S*), en (*c*), de los metil-bencil ésteres.

Los abzimas son anticuerpos con actividad catalítica que se han sintetizado artificialmente

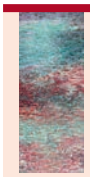
Si los principios sobre catálisis enzimática que hemos expuesto son correctos, debería ser posible diseñar enzimas artificiales. Esta hazaña se ha logrado por diferentes vías, pero aquí sólo nos referiremos a la síntesis de anticuerpos con actividad catalítica. Tales anticuerpos se conocen como **abzimas**.

El diseño de abzimas se basa en dos principios. El primero es la capacidad del sistema inmunitario para reconocer cualquier ordenación de átomos en el antígeno extraño y producir un lugar de unión en la inmonuglobulina resultante exquisitamente adaptado para unirse a dicho antígeno. El segundo es que la unión fuerte a sustratos similares al estado de transición reduce la barrera energética a lo largo del curso de la reacción (véase discusión en p. 444).

En los abzimas se utiliza como hapteno un análogo del estado de transición. Para un abzima de lipasa se emplea como hapteno un fosfonato racémico (Figura 10.57). En la Figura 10.57*b* y *c* se muestran dos sustratos éster de ácido graso enantioméricos. En la p. 448 se indica la estructura del estado de transición esperada en la hidrólisis de ésteres. Entre los diversos anticuerpos producidos por conejos tratados con el análogo del estado de transición unido a la proteína (Figura 10.57*a*), uno hidrolizaba sólo el isómero (*R*) (Figura 10.57*b*) y otro sólo el isómero (*S*). Estos abzimas aumentaban la velocidad de hidrólisis de los sustratos (*a*) y (*b*) entre 10^3 y 10^5 veces por encima de la velocidad basal de forma estereoespecífica. En otro sistema, similar a una esterasa, se ha logrado un aumento de un millón de veces, cercano a la velocidad enzimática.

Los parámetros ambientales influyen en la actividad catalítica

La actividad enzimática está afectada por una serie de parámetros externos, entre los que se cuentan el pH, temperatura y concentración salina. Estos efectos no son probablemente importantes *in vivo* en condiciones normales, pero son muy impor-



APLICACIÓN CLÍNICA 10.7

La labilidad térmica de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa produce anemia hemolítica

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es un importante enzima del hematíe en términos del mantenimiento de la integridad de la membrana. La carencia o inactivación de este enzima produce una anemia hemolítica. En otros casos está presente un enzima variante que normalmente tiene suficiente actividad para mantener la membrana pero que falla en condiciones de estrés oxidativo. Una mutación de este enzima conduce a una proteína con constantes cinéticas normales, pero con estabilidad térmica disminuida. Esta situación es especialmente crítica para el hematíe, pues éste carece de la capacidad de sintetizar proteínas y no puede renovar los enzimas a medida que se desnaturalizan. El resultado final es un tiempo de vida muy disminuido de aquellas células que tienen la G6PD inestable. Estos hematíes son también susceptibles de hemólisis inducida por fármacos. Véase Apli. Clín 15.1, p. 668.

Luzzato, L. y Mehta, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 3369.

tantes durante el establecimiento de los ensayos enzimáticos *in vitro* para medir actividades enzimáticas en el plasma de un paciente o en una muestra de tejido.

Temperatura

Las gráficas de velocidad frente a temperatura de muchos enzimas revelan una curva en forma de campana con un óptimo entre 40 y 45 °C para los enzimas de mamíferos, tal como se indica en la Figura 10.58. Por encima de esta temperatura se produce desnaturalización térmica del enzima. Entre 0 y 40 °C muchos enzimas muestran un incremento del doble de la actividad por cada 10 °C de incremento en la temperatura. En condiciones de hipotermia muchas reacciones enzimáticas están deprimidas, lo que explica la inferior demanda de oxígeno de los organismos vivos a baja temperatura. La mutación de un enzima a una forma termolábil puede tener consecuencias graves (véase Apli. Clín. 10.7).

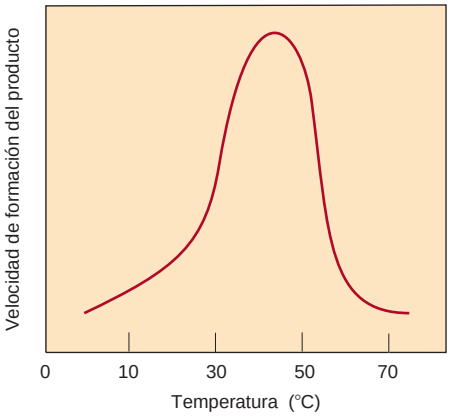


FIGURA 10.58
Dependencia de la temperatura de un enzima típico de mamífero.
A la izquierda del óptimo, la velocidad es menor porque la temperatura ambiental es demasiado baja para proporcionar suficiente energía cinética para superar la energía de activación. A la derecha del óptimo, el enzima se inactiva por desnaturalización térmica.

pH

Casi todos los enzimas muestran un perfil de la velocidad frente al pH de forma acampanada, si bien el máximo (**pH óptimo**) varía mucho según el enzima concreto. En el hombre existen tanto la fosfatasa ácida como la alcalina, con óptimos de pH muy diferentes, tal como se muestra en la Figura 10.59. La curva acampanada y su posición sobre el eje de las *x* dependen del estado particular de ionización del sustrato que estará unido de manera óptima al enzima. Esto a su vez está relacionado con la ionización de aminoácidos específicos que constituyen el centro de fijación del sustrato. Además, aquellos aminoácidos implicados en la catálisis de la reacción deben estar, para ser funcionales, en el estado iónico correcto. Por ejemplo, si el ácido aspártico está implicado en la catálisis de la reacción, el pH óptimo puede estar en la región de 4,5, en donde se ioniza el carboxilo α del aspartato, mientras que si el grupo catalítico es el ε-amino de la lisina, entonces el pH óptimo puede situarse alrededor de 9,5, el pK_a del grupo ε-amino. Los estudios de la dependencia respecto al pH de los enzimas son útiles para sugerir qué aminoácido o aminoácidos pueden ser operativos durante el proceso catalítico.

La Apli. Clín. 10.8 expone el efecto fisiológico de una mutación que conduce a un cambio en el pH óptimo de un enzima fisiológicamente importante. Tal enzima mutado puede funcionar en la ladera del perfil de pH-velocidad, pero no puede ser óptimamente activo, incluso en condiciones fisiológicas normales.

Cuando una condición anormal tal como la alcalosis (observada en el vómito severo) o acidosis (observada en la neumonía y frecuentemente en la cirugía) tiene lugar, la actividad enzimática puede disminuir, ya que el pH es inadecuado. Así, en condiciones normales, el enzima puede ser suficientemente activo para satisfacer los requerimientos normales, pero en condiciones de estrés, el enzima puede ser menos activo.

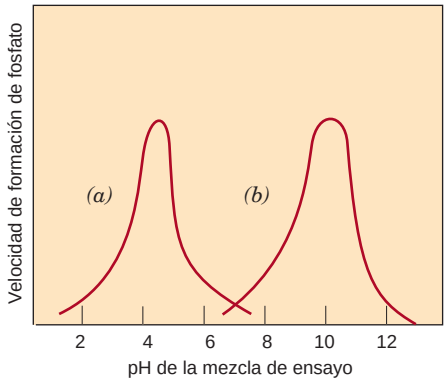
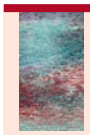


FIGURA 10.59
Dependencia del pH de las reacciones de la fosfatasa ácida (*a*) y alcalina (*b*).
En cada caso el óptimo representa el estado iónico ideal para la unión del enzima y el sustrato, así como el estado iónico correcto para los aminoácidos implicados en el proceso catalítico.



APLICACIÓN CLÍNICA 10.8

Isozimas de la alcohol deshidrogenasa con diferente pH óptimo

Además de la variación en la composición isoenzimática de la aldehído deshidrogenasa en algunos orientales (Apli. Clín. 10.2), se ha observado también otros isozimas diferentes de la alcohol deshidrogenasa. La alcohol deshidrogenasa (ADH) está codificada por tres genes que producen tres polipéptidos diferentes: α, β y γ. Se han descrito tres alelos del gen β, que difieren en una sola base nucleotídica, lo que provoca la sustitución de una arginina. Dichas sustituciones son las siguientes:

	Residuo 47	*Residuo 369*
β_1	Arg	Arg
β_2	His	Arg
β_3	Arg	Cys

La forma β_3 hepática tiene una actividad ADH con un pH óptimo cercano a 7, comparado con el óptimo de 10 para β_1 y de 8,5 para β_2. La etapa limitante de la velocidad en la alcohol deshidrogenasa es la liberación de NADH. En la unión del NADH intervienen puentes iónicos entre los fosfatos del coenzima y las argininas en posición 47 y 369. En el isozima β_1, estas interacciones iónicas no se rompen hasta que el pH es suficientemente alcalino y el grupo guanidinio de la arginina comienza a perder el protón. La sustitución por aminoácidos con valores de pK_a menores, como en β_2 y β_3, debilita la interacción y hace bajar el pH óptimo. Como se favorece la liberación de NADH, los valores de $V_{máx}$ para β_2 y β_3 son también mayores que para β_1.

Burnell, J. C., Carr, L. G., Dwulet, F. E., Edenberg, H. J., Li, T.-K. y Bosron, W. F. The human β_3 alcohol dehydrogenase subunit differs from β_1 by a Cys-for Arg-369 substitution which decreases NAD(H) binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146:1227, 1987.

10.9 APLICACIONES CLÍNICAS DE LOS ENZIMAS

Los principios de la enzimología bosquejados en las secciones anteriores encuentran aplicación práctica en el laboratorio clínico en la medición de los niveles enzimáticos y de las concentraciones de sustrato en plasma y tejido de los pacientes.

El fundamento racional de la medición de actividades enzimáticas en el plasma se basa en la premisa de que los cambios en los niveles de enzima plasmático reflejan cambios que han tenido lugar en un tejido u órgano específico. Los enzimas plasmáticos son de dos tipos: (1) uno está presente en su más alta concentración, es específico del plasma, y tiene un papel funcional en éste; (2) el otro se encuentra presente normalmente en concentraciones muy bajas y no tiene un papel funcional en el plasma. En el primer tipo se incluyen los enzimas asociados con la coagulación de la sangre (p. ej., trombina), disolución de la fibrina (plasmina) y modificación de quilomicrones (lipoproteína lipasa). Los enzimas específicos no plasmáticos son más importantes en las enfermedades de tejidos y órganos. Normalmente, los niveles plasmáticos de estos enzimas son muy bajos o nulos. Un proceso patológico puede provocar cambios en la permeabilidad de la membrana celular o incrementar la muerte celular, lo que da lugar a la liberación de enzimas intracelulares en el plasma. En casos de cambio de permeabilidad, los primeros enzimas que aparecerán en el plasma serán los de menor masa molecular y cuanto más grande sea el gradiente de concentración entre los niveles intra y extracelulares, más rápidamente difundirá el enzima. Los enzimas citosólicos aparecerán en el plasma antes que los enzimas mitocondriales y cuanto mayor sea la cantidad de tejido dañado, mayor será el incremento en el nivel plasmático. Los enzimas específicos no plasmáticos desaparecen del plasma a velocidades diferentes, según la estabilidad del enzima y su susceptibilidad al sistema reticuloendotelial.

En el diagnóstico de la implicación de un órgano específico en un proceso patológico sería ideal poder identificar enzimas específicos para cada órgano. Esto es improbable, ya que el metabolismo de muchos órganos es muy parecido. La alcohol deshidrogenasa del hígado y la fosfatasa ácida de la próstata son útiles para la identificación específica de enfermedades en estos órganos. Al margen de estos dos ejemplos, hay muy pocos enzimas que sean específicos de tejidos u órganos. Sin embargo, la proporción de diferentes enzimas varía de tejido a tejido. Este hecho, combinado con un estudio de la cinética de aparición y desaparición de determinados enzimas en el plasma, permite un diagnóstico de la implicación de un órgano específico. La Figura 10.60 ilustra la dependencia respecto al tiempo de las actividades plasmáticas de enzimas liberados por el miocardio después de un ataque de corazón. Tales perfiles permiten establecer cuándo ha tenido lugar el ataque y si el tratamiento es efectivo. La Apli. Clín. 10.9 demuestra cómo el diagnóstico de la falta de un enzima específico condujo a un tratamiento clínico racional que devolvió la salud al paciente.

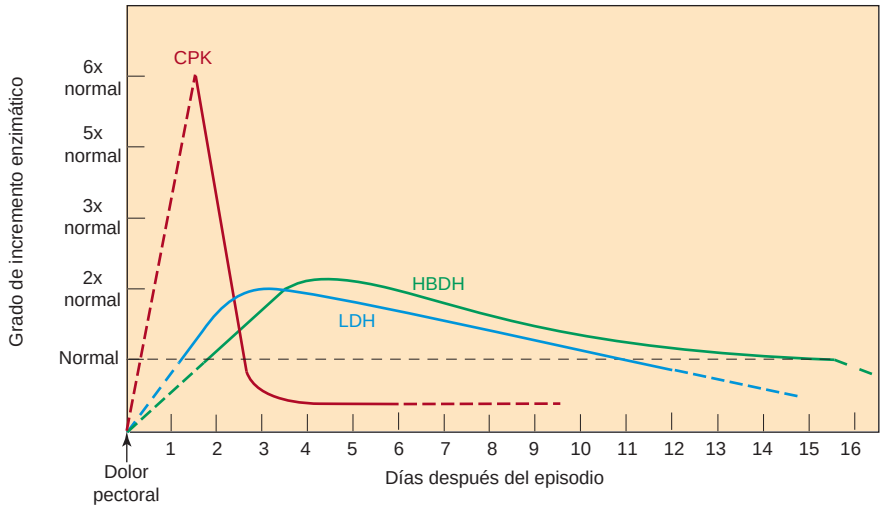


FIGURA 10.60
Cinética de la liberación de enzimas cardíacos al suero después de un infarto de miocardio.
CPK, Creatina fosfoquinasa; LDH, láctico deshidrogenasa; HBDH, α-hidroxibutírico deshidrogenasa. Estos perfiles cinéticos permiten determinar en qué fase se encuentra el paciente con respecto al infarto y a la recuperación. Observe que la CPK se eleva rápida pero brevemente; la HBDH aumenta lentamente, pero persiste.
Reproducido con permiso de Coodley, E. L. Diagnostic Enzymes. *Philadelphia: Lea & Febiger, 1970, p. 61.*

Los estudios de la cinética de aparición y desaparición de enzimas plasmáticos precisan de un ensayo enzimático válido. Un buen ensayo se basa en el mantenimiento de un buen control de temperatura y pH, así como de concentraciones saturantes de sustratos, cosustratos y cofactores. Para conseguir esto último, debe conocerse la K_m para las condiciones dadas de pH, fuerza iónica, etc., que van a utilizarse en el ensayo. Se recordará que la K_m es la concentración de sustrato a mitad de la velocidad máxima ($\frac{1}{2}V_{máx}$). Para asegurarse de que el sistema está saturado, la concentración de sustrato se incrementa entre 5 y 10 veces sobre la K_m. Con la saturación del enzima por el sustrato, la reacción es de orden cero. Este hecho se pone de relieve en la Figura 10.61. En condiciones de orden cero los cambios en la velocidad son proporcionales únicamente a la concentración de enzima. En condiciones de primer orden, la velocidad depende tanto de la concentración de sustrato como de la de enzima. La Apli. Clín. 10.10 demuestra la importancia de determinar si las condiciones de ensayo reflejan precisamente la cantidad de enzima realmente presente. Las condiciones de ensayo en el laboratorio clínico se optimizan de manera rutinaria para las propiedades del enzima normal y pueden no reflejar correctamente los niveles del enzima mutado. La dependencia respecto al pH y/o la K_m para el sustrato y cofactores puede cambiar drásticamente en un enzima mutado. En condiciones óptimas, un ensayo enzimático válido refleja una dependencia lineal de la velocidad con la cantidad de enzima. Esto se puede comprobar determinando si la velocidad de la reacción se duplica cuando la cantidad de muestra plasmática se duplica, mientras que el volumen total del ensayo se mantiene constante (Figura 10.62).

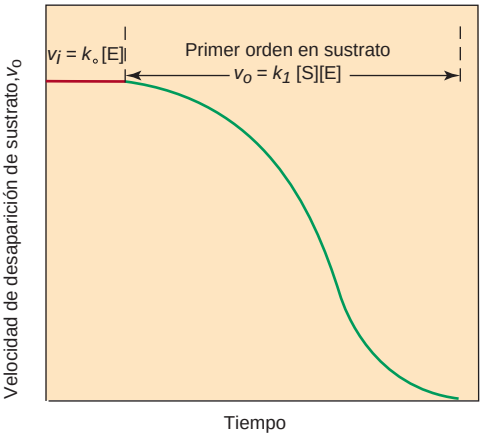


FIGURA 10.61
Relación de la concentración de sustrato con el orden de la reacción.
Cuando el enzima está completamente saturado, la cinética es de orden cero con respecto al sustrato y de primer orden respecto al enzima, esto es, la velocidad sólo depende de la concentración de enzima. Cuando el nivel de sustrato disminuye por debajo de la concentración de saturación, la cinética es de primer orden tanto en sustrato como en enzima, y por tanto es de segundo orden; esto es, la velocidad observada depende tanto del enzima como del sustrato.

En los análisis de actividad acoplados se utilizan las propiedades ópticas del NAD, NADP o FAD

Los enzimas que utilizan los coenzimas NAD^+, $NADP^+$ y FAD son fáciles de medir gracias a las propiedades ópticas del NADH, NADPH y FAD. Los espectros de absorción del NADH y del FAD en las regiones del ultravioleta y visible se muestran en la Figura 10.63. El FAD oxidado absorbe fuertemente a 450 nm, mientras que el NADH presenta máxima absorción a 340 nm. La concentración de FAD y de NADH está relacionada con su absorción de la luz en el máximo de absorción respectivo mediante la **relación de Lambert–Beer**

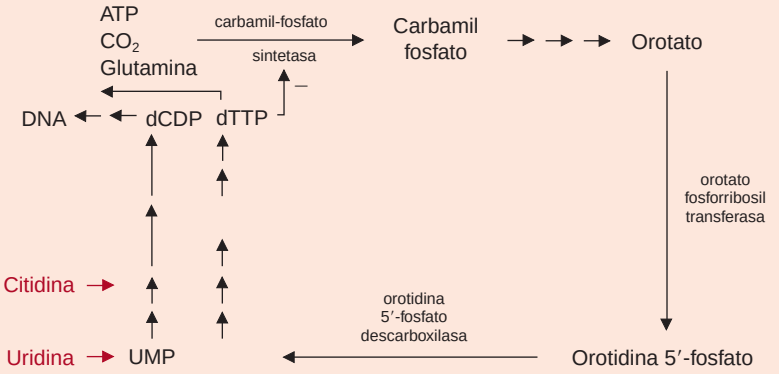
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

APLICACIÓN CLÍNICA 10.9
Identificación y tratamiento de una deficiencia enzimática

Las deficiencias enzimáticas conducen normalmente a una mayor acumulación de metabolitos intermediarios específicos en el plasma y, por tanto, en la orina. El reconocimiento de los intermedios que se acumulan en fluidos biológicos es útil para descubrir los posibles defectos enzimáticos. Después de establecer la deficiencia enzimática, los metabolitos que aparecen normalmente en la ruta, pero aparecen más allá del bloqueo, pueden ser suministrados exógenamente con el fin de superar los defectos metabólicos de la deficiencia enzimática.

En la aciduria orótica hereditaria existe una doble deficiencia enzimática en la ruta biosintética de las pirimidinas que conduce a la acumulación de ácido orótico. Tanto la orotato fosforribosiltransferasa como la orotidina 5′-fosfato descarboxilasa son deficitarias, lo que provoca la disminución de los niveles *in vivo* de CTP y TTP. Las dos actividades son deficitarias debido a que se encuentran en dominios separados de un único polipéptido multifuncional de 480 aminoácidos. El dCTP y el dTTP, que provienen del CTP y TTP, son necesarios para la división celular. En estas enfermedades de deficiencia enzimática, los pacientes están pálidos, débiles y no consiguen desarrollarse. El suministro de las pirimidinas ausentes en forma de uridina y citidina promueve el crecimiento, el bienestar general y también la disminución de la excreción de ácido orótico. Esto último tiene lugar porque el TTP y el CTP formados a partir de la uridina y citidina suministradas reprimen la carbamil fosfato sintetasa, la etapa obligada, mediante retroinhibición, lo que da como resultado una disminución en la producción de orotato.

Webster, D. R., Becroft, D. M. O. y Suttie, D. P. Hereditary orotic aciduria and other diseases of pyrimidine metabolism. En C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 1799.



en la que l es la longitud del camino óptico de la cubeta del espectrofotómetro (normalmente 1 cm), ε es la absorbancia de una solución molar de la sustancia medida a una longitud de onda específica, A es la absorbancia y c es la concentración. La absorbancia es el logaritmo de la transmitancia (I_0/I). I_0 es la fracción de luz transmitida en ausencia de muestra e I en presencia de muestra. EI término ε es una constante que varía según la sustancia; su valor puede encontrarse en un manual de

APLICACIÓN CLÍNICA 10.10
Ambigüedad en el análisis de enzimas mutados

Las mutaciones de genes estructurales que conducen a la producción de enzimas con aumento o disminución en K_m son frecuentes. Un ejemplo de esta cuestión es el de un paciente con hiperuricemia y gota, cuya hipoxantina–guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) eritrocitaria mostraba poca actividad en los ensayos *in vitro*. Este enzima está implicado en la recuperación de bases purínicas y cataliza la reacción

$$\text{hipoxantina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{inosina monofosfato} + PP_i$$

en la que PRPP es fosforribosilpirofosfato.

La ausencia de la actividad HGPRT da lugar a una enfermedad neurológica grave conocida como síndrome de Lesch–Nyan (véase p. 836); sin embargo, este paciente no presentaba signos clínicos de esa enfermedad. Las pruebas inmunológicas con un anticuerpo específico para el enzima revelaron igual cantidad de material que reaccionaba cruzadamente en los hematíes del paciente que en los controles normales. La conclusión es que el enzima se produce pero es inactivo en el ensayo *in vitro*. Incrementando la concentración de sustrato en el ensayo, podía medirse una actividad completa en los hemolizados de eritrocitos del paciente. Esta anomalía se explica como una mutación en el centro de fijación del sustrato de la HGPRT, que conduce a una K_m más elevada. Ni la concentración de sustrato del ensayo ni la de los eritrocitos era suficientemente alta para fijarse al enzima. Este caso refuerza el hecho de que una determinación enzimática precisa depende de que la cinética sea de orden cero, esto es, que el enzima esté saturado de sustrato.

Sorenson, L. y Benke, P. J. Biochemical evidence for a distinct type of primary gout. *Nature* 213:1122, 1967.

bioquímica. En una solución ópticamente clara, la concentración *c* puede calcularse determinando la absorbancia *A* y sustituyéndola en la ecuación de Lambert–Beer.

Muchos enzimas no emplean ni NAD^+ ni FAD, pero generan productos que pueden ser utilizados por un enzima dependiente de NAD^+ o FAD. Por ejemplo, la glucoquinasa cataliza la reacción

$$\text{glucosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato} + \text{ADP}$$

Tanto el ADP como la glucosa 6-fosfato (G6P) son difíciles de medir directamente; sin embargo, el enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa cataliza la reacción,

$$\text{glucosa 6-fosfato} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{6-fosfogluconolactona} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

De este modo, añadiendo un exceso del enzima G6P deshidrogenasa y $NADP^+$ a la mezcla de ensayo, la velocidad de producción de G6P por la glucoquinasa es proporcional a la velocidad de reducción del $NADP^+$ que puede medirse directamente en el espectrofotómetro.

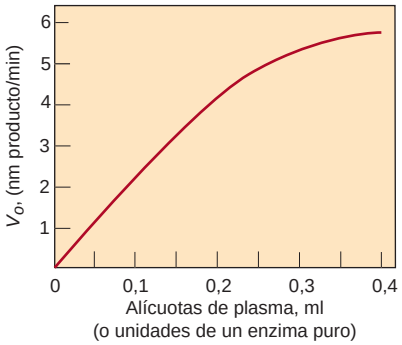
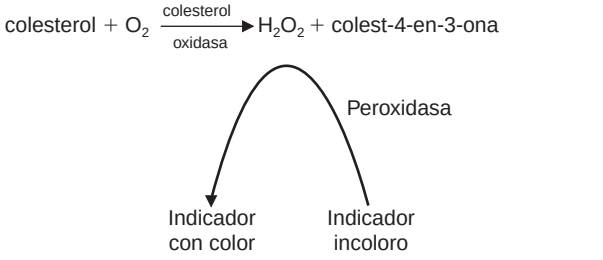


FIGURA 10.62
Comprobación de la validez de un ensayo enzimático.
La línea muestra lo que cabe esperar en una reacción cuando la concentración de sustrato se mantiene constante y se incrementan las alícuotas del enzima. En este ejemplo concreto, la linealidad entre la velocidad inicial observada y la cantidad de enzima, puro o en muestra de plasma, se observa sólo hasta 0,2 ml de plasma o 0,2 unidades de enzima puro. Si se midiese la velocidad con una alícuota de plasma mayor de 0,2 ml, se subestimaría la cantidad de enzima presente en la muestra.

Los analizadores clínicos utilizan enzimas inmovilizados como reactivos

Actualmente se emplean enzimas como reactivos químicos en analizadores clínicos de mesa que pueden emplearse en oficinas o, con fines de detección, en centros comerciales o calles. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo en pocos minutos pruebas de detección de colesterol y triacilgliceroless en unos pocos minutos con 10 mL de plasma. Los componentes activos en el sistema de ensayo son la colesterol oxidasa para la determinación del colesterol, y la lipasa para los triacilgliceroles. Los enzimas se inmovilizan en una bicapa junto con las sales tampón, los cofactores o cosustratos y los reactivos indicadores necesarios. Estos ingredientes se disponen en un soporte multicapa del tamaño y el grosor de una diapositiva de 35 mm. La muestra de plasma proporciona el sustrato y el agua necesarios para activar el sistema. En el caso de la colesterol oxidasa se produce peróxido de hidrógeno que a continuación oxida la forma incolora de un indicador, dando un producto coloreado que se puede medir por espectroscopia de reflectancia. Entre los reactivos se incluye peroxidasa para que catalice la última reacción.



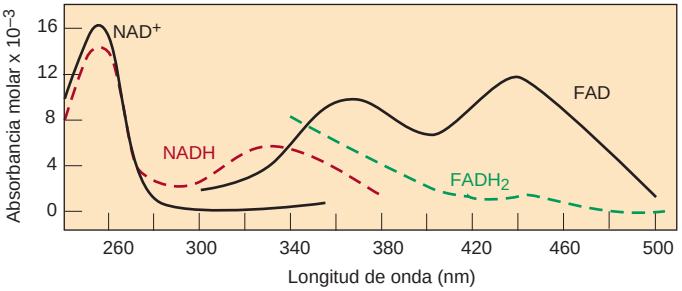


FIGURA 10.63
Espectros de absorción de los coenzimas de nicotinamida y flavina.
La forma reducida del NAD (NADH) absorbe fuertemente a 340 nm. La forma oxidada de los coenzimas de flavina absorbe fuertemente a 450 nm. De esta manera se puede seguir la velocidad de reducción del NAD^+ observando el incremento de absorbancia a 340 nm, y la formación de $FADH_2$ siguiendo la disminución de absorbancia a 450 nm.

Cada paquete de "diapositivas" se elabora para medir una sustancia o enzima específico, y puede ser almacenado en frío para ser utilizado cuando se necesite. En muchos casos, el paquete contiene varios enzimas en un sistema de ensayo acoplado que en último término produce un nucleótido reducido o un producto coloreado que se puede medir espectroscópicamente. El desarrollo de esta tecnología ha sido posible, en parte, gracias a que los enzimas implicados se estabilizan cuando se unen a matrices inmovilizadas y a que se almacenan en seco o en presencia de un disolvente estabilizador como el glicerol.

Los inmunoensayos unidos a enzima utilizan enzimas como indicadores

La química clínica moderna se ha beneficiado mucho de la conjunción de la química de enzimas y la inmunología. Se unen anticuerpos específicos para un antígeno proteico a un enzima indicador tal como la peroxidasa de rábano para obtener un ensayo muy específico y sensible. Tras la unión al antígeno del anticuerpo conjugado con peroxidasa, ésta se emplea para generar un producto coloreado que puede medirse y cuya concentración está relacionada con la cantidad de antígeno contenida en la muestra. El sistema amplifica mucho la señal gracias a la naturaleza catalítica del enzima. Este ensayo se ha denominado **ELISA**, las siglas inglesas correspondientes a ensayo de inmunoadsorbente ligado a enzima.

La aplicación de estos principios se pone de manifiesto en un ensayo para la detección de las proteínas antigénicas de la envoltura del **virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)**. Este virus puede dar lugar al desarrollo del **síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA)**. Se obtienen anticuerpos de conejo contra las proteínas de la cubierta del VIH. Además, se obtienen anticuerpos indicadores de cabra contra las IgG de conejo específicas de las proteínas del VIH. El enzima, la peroxidasa de rábano, se une a estos anticuerpos de cabra contra IgG de conejo. La prueba para el virus se lleva a cabo incubando el suero del paciente en un disco de poliestireno al que se adsorben las proteínas de la muestra de suero. A continuación se saturan todos los sitios de adsorción de proteína que han quedado libres en el disco tras la incubación con el suero del paciente incubándolo con una solución de una proteína no específica tal como la albúmina sérica bovina. Se incuba entonces el disco con las IgG de conejo contra las proteínas del VIH; durante este tiempo las IgG se unirán a cualquier proteína de la envoltura del virus que esté adsorbida al disco de poliestireno. Las IgG de conejo no unidas se lavan con tampón. Se añade luego al disco la solución de anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugadas con peroxidasa que se unen a cualquier IgG de conejo que esté unida al disco a través de las proteínas de la cubierta del VIH. Se lava el exceso de anticuerpo conjugado con peroxidasa. Se añaden al disco los sustratos de la peroxidasa, y la intensidad del color que aparece tras un cierto período de tiempo es una medida de la cantidad de proteínas de la cubierta del VIH presente en un volumen dado del plasma del paciente, cantidad que se puede calcular mediante una curva patrón. Este procedimiento se esquematiza en la Figura 10.64. Este ensayo amplifica la señal debido a la naturaleza catalítica del grupo indicador, el enzima peroxidasa. Ensayos de amplificación enzimática como éste permiten la medición de cantidades extraordinariamente bajas de antígenos.

La medición de isozimas se utiliza para el diagnóstico

Los **isozimas** (o isoenzimas) son enzimas que catalizan la misma reacción, pero que se desplazan de forma diferente en la electroforesis. Sus propiedades físicas pueden ser también, aunque no necesariamente, diferentes. El mecanismo más común de formación de isoenzimas supone el ordenamiento de subunidades que provienen de dos loci genéticos diferentes en distintas combinaciones para formar el enzima polimérico activo. Los isozimas que tienen una amplia aplicación clínica son la lactato deshidrogenasa, la creatina quinasa y la fosfatasa alcalina. La **creatina fosfoquinasa** (CPK) (véase p. 1028) aparece en forma de dímero con dos tipos de subunidades, la M (tipo músculo) y la B (tipo cerebro). En el cerebro, ambas subunidades son, desde el punto de vista electroforético, del mismo tipo y se designan B. En el músculo esquelético, las subunidades son ambas del tipo M. El isozima que contiene subunidades del tipo B y del tipo M (MB) sólo se encuentra en el miocardio. Otros tejidos contienen cantidades variables de los isozimas MM y BB. Los isozimas se numeran empezando por la especie que se desplaza más rápidamente hacia el ánodo en la elecroforesis, y son CPK_1 (BB), CPK_2 (MB) y CPK_3 (MM).

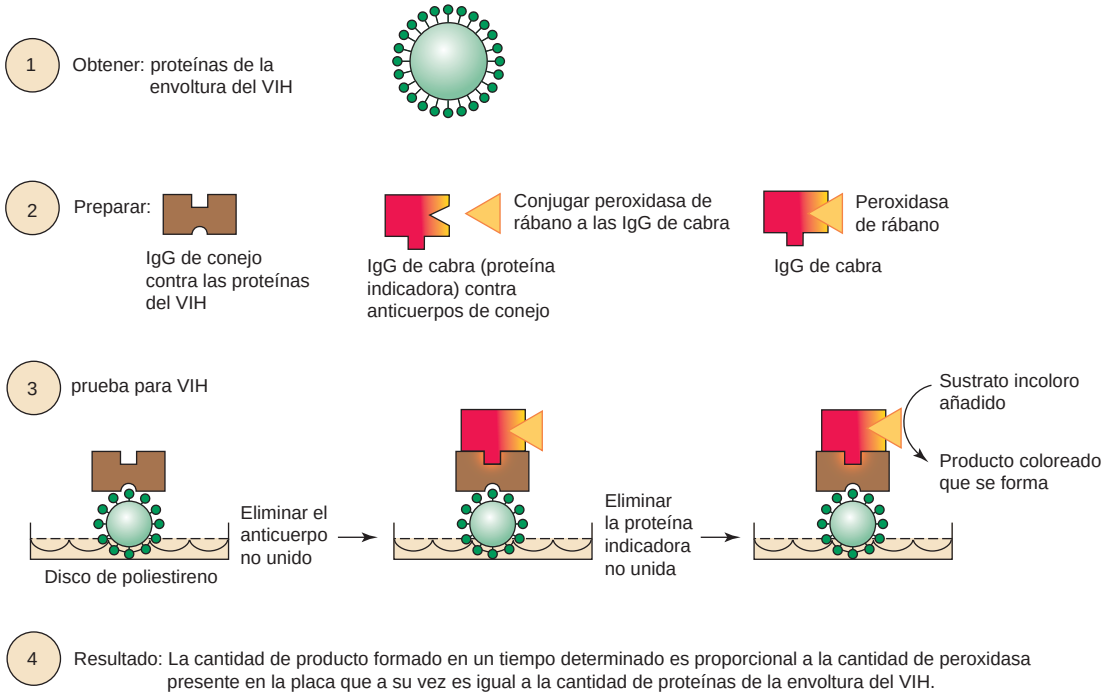


FIGURA 10.64
Esquema del sistema de ELISA (ensayo de inmunoadsorbente unido a enzima) para la detección de las proteínas de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La **lactato deshidrogenasa** es un enzima tetramérico que contiene sólo dos subunidades distintas: las designadas H del corazón (miocardio) y las M del músculo. Estas dos subunidades se combinan de cinco formas diferentes. Los isozimas de la lactato deshidrogenasa, composición de subunidades y localización principal son:

Tipo	*Composición*	*Localización*
LDH_1	HHHH	Miocardio y eritrocito
LDH_2	HHHM	Miocardio y eritrocito
LDH_3	HHMM	Cerebro y riñón
LDH_4	HMMM	
LDH_5	MMMM	Higado y músculo esquelético

Para ilustrar cómo los análisis cinéticos de las actividades enzimáticas en el plasma son útiles en medicina, en la Figura 10.65 se representan los niveles de algunos de los isozimas de la CPK y de la LDH en función del tiempo transcurrido después del infarto de miocardio. Después de la lesión del tejido cardíaco, la rotura celular libera CPK_2 a la sangre dentro de las primeras 6–18 horas después de un infarto, pero la liberación de LDH se retrasa respecto a la aparición de CPK_2 en 1–2 días. Normalmente, la actividad del isozima LDH_2 es mayor que la del LDH_1; sin embargo, en el caso de infarto, la actividad de LDH_1 supera a la de LDH_2 en el mismo momento, aproximadamente, en que los niveles de CPK_2 vuelven a la línea base (48–60 h). La Figura 10.66 muestra las fluctuaciones de los cinco isozimas de la LDH después de un infarto. El aumento en la relación entre LDH_2 y LDH_1 puede apreciarse en la señal de las 24 h. El cambio de los isozimas de la LDH junto a una CPK_2 incrementada es diagnóstico de un infarto de miocardio virtualmente en el 100% de los casos. Un aumento en la actividad de la LDH_5 es un indicador de congestión hepática. De este modo se pueden seguir complicaciones secundarias de la lesión cardíaca.

El método electroforético de determinación de enzimas cardíacos es demasiado lento y poco sensible para que resulte útil en situaciones de urgencia. Los ensayos de ELISA basados en anticuerpos monoclonales contra la CPK_2 son, a la vez, suficientemente rápidos (30 minutos) y sensibles para detectar CPK_2 en el suero al cabo de una hora de producirse el ataque de corazón.

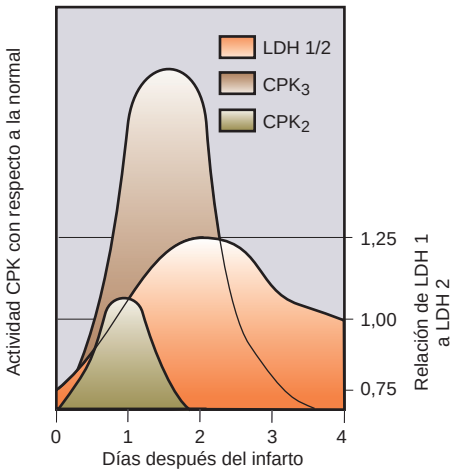


FIGURA 10.65
Cambios característicos en los isozimas séricos de CPK y LDH después de un infarto de miocardio.
El isozima CPK_2 (MB) aumenta hasta un máximo dentro del primer día del infarto. CPK_3 sigue más lento, alrededor de un día, a la CPK_2. El nivel total de LDH aumenta más lentamente. El incremento de LDH_1 y LDH_2 dentro de las 12–24 h junto con un incremento de CPK_2 son un diagnóstico del infarto de miocardio.

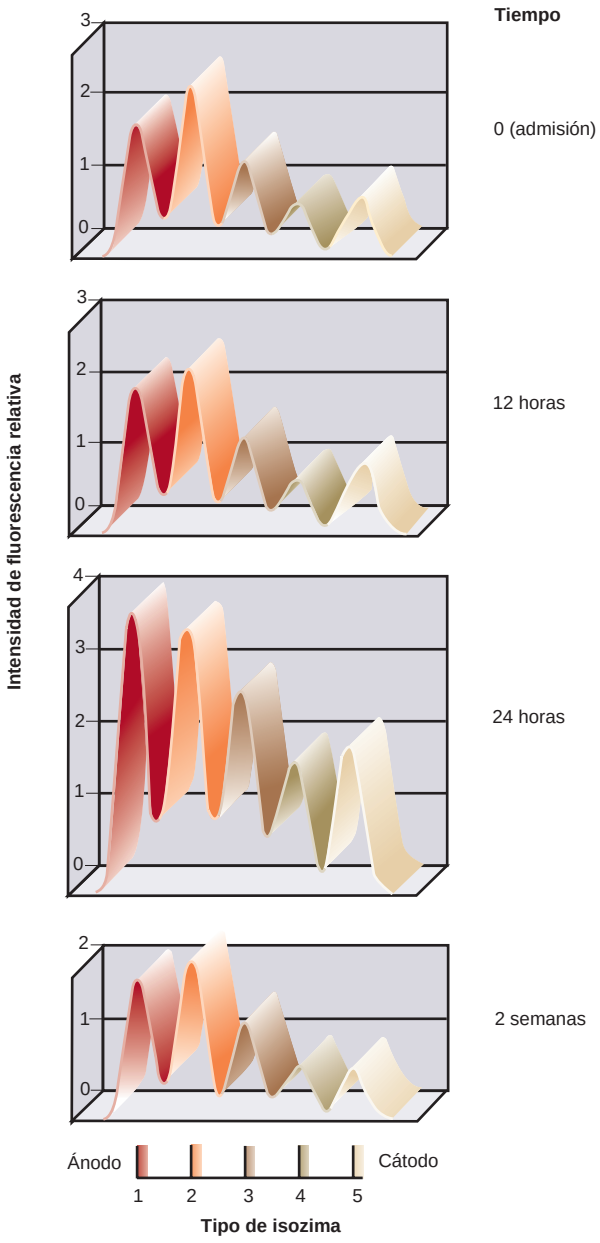


FIGURA 10.66
Trazos densitométricos de los isozimas de la LDH a intervalos de tiempo después de un infarto de miocardio.
La LDH total aumenta y la LDH_1 se hace mayor que la LDH_2 entre las 12 y 24 h. El incremento de la LDH_5 es diagnóstico de una congestión hepática secundaria. Obsérvese que las escalas de los ejes Y no son idénticas. Después de la electroforesis sobre geles de agarosa, la actividad LDH se ensaya midiendo la fluorescencia del NADH formado en la reacción catalizada por la LDH.
Cortesía del Dr. A. T. Gajda, Clinical Laboratories, The University of Arkansas for Medical Science.

Algunos enzimas se utilizan como agentes terapéuticos

En unos pocos casos, los enzimas se han utilizado como medicamentos en la terapia de problemas médicos específicos. La **estreptoquinasa** es una mezcla de enzimas preparada a partir de estreptococos; es útil para disolver coágulos de sangre formados en los infartos de miocardio y de las extremidades inferiores. La estreptoquinasa activa el proenzima fribrinolítico **plasminógeno** que se halla presente normalmente en el plasma. El enzima activado es la plasmina.

La **plasmina** es una serina proteasa que corta la fibrina insoluble del coágulo en varios componentes solubles (véase p. 1045). Otra serina proteasa, el activador tisular del plasminógeno, t-PA humano, se produce comercialmente utilizando *Escherichia coli (E. coli)* recombinante. El t-PA se emplea para disolver coágulos en pacientes de infarto de miocardio (véase p. 1045); además, activa el plasminógeno del paciente.

La terapia con **asparaginasa** se utiliza para algunos tipos de leucemia en adultos. Las células tumorales presentan un requerimiento nutricional de asparagina, lo que las obliga a captarla del plasma del huésped. La administración intravenosa (i.v.) de asparaginasa disminuyen los niveles de asparagina del plasma del huésped, lo que conlleva la disminución de la viabilidad del tumor.

La mayoría de los enzimas tienen una vida media corta en la sangre; en consecuencia, se requieren enormes cantidades de enzima para mantener el nivel terapéutico adecuado. Actualmente, se trabaja en la línea de incrementar la estabilidad enzimática mediante el acoplamiento del enzima a matrices sólidas, y de implantar estos materiales en áreas bien perfundidas. En el futuro, quizás se pueda llegar al **reemplazamiento enzimático** en individuos con una deficiencia genética en un enzima dado.

Los enzimas unidos a matrices insolubles se utilizan como reactores químicos

Enzimas específicos unidos a matrices insolubles se emplean en la industria farmacéutica como reactores químicos altamente específicos. Así, la β-galactosidasa inmovilizada se utiliza para disminuir la concentración de lactosa en la leche para las personas con intolerancia a ese glúcido. En la producción de prednisolona, la esteroide 11-β-hidroxilasa y una δ-1,2-deshidrogenasa inmovilizadas convierten, de forma rápida, estereoespecífica y económica, un precursor barato de la prednisolona.

10.10 | REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Hasta este momento nos hemos centrado en la caracterización física y química de enzimas individuales, pero desde el punto de vista fisiológico, debemos atender a la integración de muchos enzimas en una vía metabólica y a las interrelaciones de los productos de una vía con la actividad metabólica de otras vías. El control de una vía tiene lugar mediante modulación de la actividad de uno o más enzimas claves de la ruta. Uno de los enzimas clave es el **enzima limitante de velocidad**; éste es el enzima con la $V_{máx}$ más baja y, normalmente, se encuentra en las primeras etapas de la vía.

Otro enzima es el que cataliza la **etapa obligada** de la vía, es decir, la primera reacción irreversible que sólo pertenece a una vía metabólica. El enzima limitante de velocidad no ha de ser necesariamente el enzima asociado a la etapa obligada. En las secciones sobre metabolismo se presentarán ejemplos específicos de estos enzimas reguladores.

La actividad del enzima asociado a la etapa obligada o a la etapa limitante de velocidad se puede regular de diversas maneras. Primero, se puede regular la cantidad absoluta del enzima mediante cambios en la síntesis *de novo* del mismo. Segundo, la actividad del enzima puede ser modulada mediante activadores, inhibidores y por modificación covalente a través de los mecanismos tratados anteriormente. Finalmente, la actividad de la ruta se puede regular separando físicamente la ruta del sustrato inicial y controlando el acceso del sustrato a los enzimas de la vía. Esta situación se denomina **compartimentación**.

Generalmente, las vías anabólicas y las catabólicas están segregadas en distintos orgánulos con el fin de maximizar la economía celular. No sería lógico que la oxidación de ácidos grasos tuviese lugar al mismo tiempo y en el mismo compartimiento que la biosíntesis de los ácidos grasos. Si ello sucediese, se produciría un ciclo inútil. Al mantener la biosíntesis de ácidos grasos en el citoplasma y su oxidación en la mitocondria, se puede ejercer un control regulando el transporte de intermedios comunes a través de la membrana mitocondrial. La Tabla 16.4 (p. 717) contiene una compilación de alguna de las vías metabólicas y su distribución intracelular.

Tal como se indicó anteriormente, la velocidad de cualquier reacción depende de la cantidad de enzima presente. Muchos enzimas controladores de velocidad se hallan presentes a concentraciones muy bajas. Se puede sintetizar más enzima o se pueden reprimir las velocidades de síntesis existentes a través de activación hormonal de los mecanismos que regulan la expresión génica. En algunos casos, los sustratos pueden reprimir la síntesis del enzima. Por ejemplo, la glucosa reprime la síntesis *de novo* de la piruvato carboxiquinasa, que es el enzima limitante de velocidad en la conversión del piruvato en glucosa. Si hay abundancia de glucosa asequible, no existe razón para sintetizar glucosa. Este efecto de la glucosa puede producirse a través de la insulina, y no es una retroinhibición directa.

Muchos enzimas reguladores de velocidad tienen vidas medias relativamente cortas; por ejemplo, la de la piruvato carboxiquinasa es de 5 h. Desde un punto de vista teleológico esto es razonable, ya que proporciona un mecanismo para efectuar fluctuaciones en la actividad de una vía mucho más amplias de lo que sería posible mediante inhibición o activación de los niveles existentes de enzima.

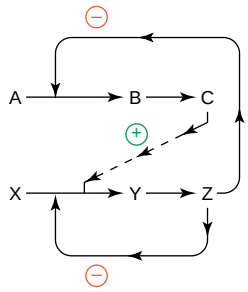


FIGURA 10.67
Modelo de retroinhibición y regulación cruzada.
La barra abierta indica inhibición y la línea discontinua activación. El producto Z controla por regulación cruzada la producción de C gracias a su acción inhibidora sobre el enzima responsable de la conversión de A en B. A su vez C controla mediante el mismo mecanismo la producción de Z. Entretanto Z inhibe su propia síntesis por retroinhibición de la conversión de X en Y.

La regulación a corto plazo tiene lugar mediante la modificación de la actividad del enzima existente. Por ejemplo, cuando la concentración celular de desoxirribonucleótidos alcanza unos niveles suficientes para que la célula pueda llevar a cabo la síntesis del DNA, el enzima clave de la ruta sintética es inhibido por los productos finales, lo que da como resultado la interrupción de la ruta. Este tipo de control se denomina **retroinhibición (inhibición feed-back)**.

La inhibición puede tomar la forma de inhibición competitiva o inhibición alostérica. En cualquier caso, la K_m aparente puede incrementarse por encima de los niveles de sustrato *in vivo*, por lo que la reacción cesa o disminuye de velocidad.

Además de la regulación dentro de la vía, también tiene lugar la regulación sobre otras vías. Este fenómeno se denomina regulación cruzada. En la **regulación cruzada**, un producto de una ruta actúa como inhibidor o activador de un enzima presente en los primeros pasos de otra ruta, tal como se muestra en la Figura 10.67. Un buen ejemplo, que se comentará con más profundidad en la p. 844, lo constituye la regulación cruzada de la producción de los cuatro desoxirribonucleótidos para la síntesis de DNA. Esto es importante porque los cuatro deben estar presentes en cantidades similares para la síntesis del DNA.

Un ejemplo de regulación covalente reversible es la glucógeno fosforilasa, en la que las formas interconvertibles activa e inactiva son proteínas fosforiladas y desfosforiladas, respectivamente. Las proteína quinasas y las proteína fosfatasas también están reguladas por fosforilación y desfosforilación. Otros ejemplos de modificación covalente reversible incluyen acetilación–desacetilación, adenililación–desadenililación, uridililación–desuridililación y metilación–desmetilación. El esquema de fosforilación-desfosforilación es el más común.

BIBLIOGRAFÍA

Blackburn, G. M., Kang, A. S. Kingsbury, G. A. y Burton, D. R. Review of abzymes. *Biochem. J.* 262:381, 1989.

Bugg, T. *An introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. London: Blackwell Press, 1997.

Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. London: Portland Press, 1995

Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* New York: Freeman, 1999.

Kyte, J. *Mechanism in Protein Chemistry*. New York: Garland Publishing, 1995.

Keffer, J. H. Myocardial Markers of Injury. *Am. J. Clin. Path.* 105:305, 1996.

Knowles, J. R. y Alberty, W. J. Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry* 15:5631, 1976.

Kraut, J. How do enzymes work? *Science* 242:533, 1988.

Lerner, R. A., Benkovic, S. J. y Schultz, P. G. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* 252:659, 1991.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. En todos los enzimas, el centro activo:
   A. contiene el centro de fijación del sustrato.
   B. es contiguo al centro de fijación del sustrato en la secuencia primaria.
   C. reside en una región de la secuencia primaria alejada del centro de fijación del sustrato.
   D. contiene un ion metálico como grupo prostético.
   E. contiene las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en la catálisis de la reacción.

2. ¿Cuál de los siguientes tipos de oxidorreductasas forma normalmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como uno de sus productos?
   A. deshidrogenasas.
   B. oxidasas.
   C. oxigenasas.
   D. peroxidasas.
   E. ninguno de los anteriores.

3. Aunque la catálisis enzimática es reversible, una reacción dada puede parecer irreversible:
   A. si los productos son mucho más estables termodinámicamente que los reactivos.
   B. en condiciones de equilibrio.
   C. si se acumula el producto.
   D. a elevada concentración de enzima.
   E. a elevada temperatura.

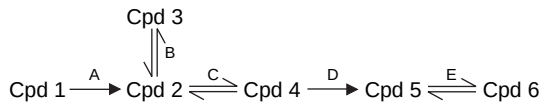
4. Los cationes metálicos pueden llevar a cabo todo lo siguiente EXCEPTO:
   A. ceder un par de electrones a grupos funcionales que se encuentran en la estructura primaria de la proteína enzimática.
   B. funcionar como ácidos de Lewis en los enzimas.
   C. participar en procesos de oxidación–reducción.
   D. estabilizar la conformación activa del enzima.
   E. formar quelatos con el sustrato, siendo este quelato el verdadero sustrato.

5. Los enzimas pueden ser específicos respecto a todo lo siguiente EXCEPTO:
   A. la identidad química del sustrato.
   B. la masa atómica de los elementos del grupo reactivo (por ej. ^{12}C pero no ^{14}C).
   C. la actividad óptica de un producto formado a partir de un sustrato simétrico.
   D. el tipo de reacción catalizada.
   E. qué miembro de un par de isómeros ópticos reaccionará.

6. Todo lo siguiente puede aislarse químicamente EXCEPTO:
   A. los enzimas.
   B. los complejos enzima–sustrato.
   C. los complejos enzima–inhibidor.
   D. los intermedios covalentes enzima–sustrato.
   E. los estados de transición.

7. ¿Cuál de los siguientes fenómenos da lugar necesariamente a la formación de compuesto intermedio enzima–sustrato?
   A. tensión en el sustrato.
   B. catálisis ácido–base.
   C. efectos entrópicos.
   D. regulación alostérica.
   E. catálisis covalente.

8. En la secuencia de reacciones mostrada a continuación, el mejor punto para controlar la producción del compuesto 6 es la reacción:



   A. A.
   B. B.
   C. C.
   D. D.
   E. E.

9. Si la actividad plasmática de un enzima intracelular es anormalmente alta, todo lo siguiente puede ser una explicación válida EXCEPTO:
   A. la velocidad de eliminación de ese enzima del plasma podría estar disminuida.
   B. podría haber ocurrido una lesión en un tejido.
   C. el enzima podría haberse activado.
   D. la determinación de la distribución de sus isozimas podría arrojar una información valiosa.
   E. podría haberse incrementado la velocidad de síntesis del enzima.

10. Entre los tipos de regulación fisiológica de la actividad enzimática se encuentran todos los siguientes EXCEPTO:
    A. la modificación covalente.
    B. los cambios en la velocidad de síntesis de los enzimas.
    C. la activación alostérica.
    D. la inhibición suicida.
    E. la inhibición competitiva.

Preguntas 11 y 12: Un hombre con antepasados japoneses experimentó un enrojecimiento severo y un ritmo cardíaco muy elevado al consumir una bebida alcohólica. Su compañero, un hombre caucásico, no tuvo los mismos síntomas aun cuando ya había consumido su segunda copa. Estos efectos fisiológicos están relacionados con la presencia de acetaldehído (CH_3CHO) generado a partir del alcohol. El acetaldehído se elimina normalmente mediante la reacción de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial que cataliza la reacción

$$CH_3CHO + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3COO^- + NADH + H^+$$

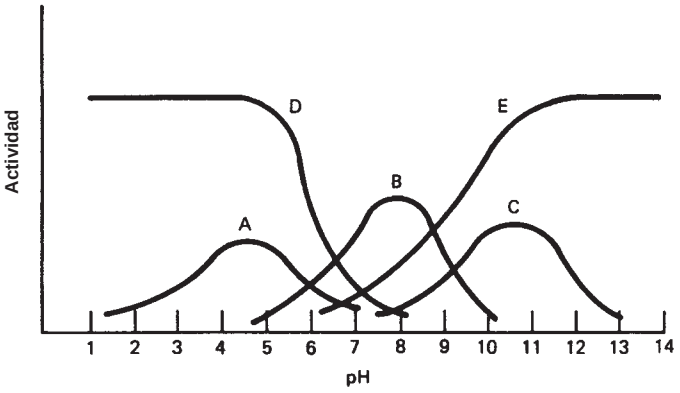
11. La aldehído deshidrogenasa es:
    A. una oxidorreductasa.
    B. una transferasa.
    C. una hidrolasa.
    D. una liasa.
    E. una ligasa.

12. La explicación de la diferencia de efectos fisiológicos es que el hombre japonés carecía de la aldehído deshidrogenasa normal y sólo poseía un isómero citosólico. El isómero citosólico:
    A. no reacciona con el CH_3CHO.
    B. activa el enzima que produce CH_3CHO.
    C. difiere del enzima mitocondrial en que tiene una K_m mayor hacia el CH_3CHO.
    D. debería tener una mayor afinidad por el sustrato que el enzima mitocondrial.
    E. produce una baja concentración de acetaldehído en estado estacionario después del cosumo de alcohol.

Preguntas 13 y 14: Un técnico de laboratorio que trabaja con compuestos organosfosforados está obligado a una prueba semanal para la actividad acetilcolinesterasa en sangre. Normalmente, la actividad esterasa permanece relativamente constante durante cierto tiempo hasta que de manera abrupta desciende a cero. Cuando sucede esto, el técnico ha de dejar de trabajar inmediatamente con los compuestos organofosforados. Los compuestos organofosforados forman ésteres estables con el grupo hidroxilo de una serina crítica de la esterasa.

13. En este tipo de enzima, la serina transfiere un protón a un residuo de histidina. La serina actúa como un:
    A. ácido específico.
    B. ácido general.
    C. base específica.
    D. base general.
    E. catalizador estabilizador de transición

14. La histidina acepta un protón en el mecanismo anterior y, en un paso posterior, cede el protón a otra especie. ¿A cuál de las curvas del gráfico siguiente se parecería probablemente el perfil de actividad dependiente del pH de un enzima con un residuo de histidina?



   A. Curva A
   B. Curva B
   C. Curva C
   D. Curva D
   E. Curva E

Problemas

15. Se realizó un experimento en el que se midió la velocidad frente a la concentración de sustrato, primero en ausencia de la sustancia A y seguidamente en su presencia. Se obtuvieron los datos siguientes

[S] (μM)	*Velocidad en ausencia de A* ($\mu mol\ min^{-1}$)	*Velocidad en presencia de A* ($\mu mol\ min^{-1}$)
2,5	0,32	0,20
3,3	0,40	0,26
5,0	0,52	0,36
10,0	0,69	0,56

¿La sustancia A es un activador o un inhibidor? Si es un inhibidor, ¿qué clase de inhibidor es?

16. Para el experimento del Problema 15, calcule la K_m y la V_{max} tanto en ausencia como en presencia de la sustancia A. ¿Son coherentes estos resultados con su respuesta al Problema 15?

RESPUESTAS

1. **E** El centro activo contiene toda la maquinaria, incluidas las cadenas laterales de los aminoácidos, involucrada en la catálisis de la reacción. A–D son posibles, pero ninguna es necesariamente cierta.
2 **B** Muchas oxidasas generan H_2O_2 como producto de la transferencia de dos electrones del dador al oxígeno. A: las deshidrogenasas producen coenzimas de piridina o de flavina reducidos. C: las oxigenasas adicionan uno o dos átomos de oxígeno al sustrato. D: las peroxidasas degradan el H_2O_2.
3 **A** En la reacción inversa, los productos estables no reaccionan a una velocidad apreciable. B: En el equilibrio, la velocidad de las reacciones directa e inversa es idéntica. C: La acumulación de productos favorecería la reacción inversa. D: Los enzimas únicamente catalizan las reacciones sin alterar el equilibrio de las mismas. E: La temperatura altera la velocidad de la reacción e incluso puede alterar la posición del equilibrio, pero no interconvierte reacciones reversibles e irreversibles.
4 **A** Los cationes metálicos son deficitarios en electrones y pueden aceptar pares de electrones, actuando como ácidos de Lewis, pero no ceden electrones a otros grupos funcionales. C: Por el contrario, a veces aceptan pares de electrones procedentes de grupos de las cadenas laterales de los aminoácidos. D: Actuando de esta manera, pueden ser quelados, lo que puede estabilizar la estructura adecuada. E: A veces son quelados por el sustrato, siendo el quelato el verdadero sustrato.
5 **B** Los enzimas no distinguen entre diferentes núclidos de un elemento, aunque la velocidad de la reacción de un núclido más pesado puede ser menor que la de uno más ligero. A,D: Los enzimas presentan especificidad de sustrato y de tipo de reacción. C,E: La asimetría del sitio de fijación permite normalmente que sólo reaccione un miembro del par de isómeros ópticos y que se forme solamente un isómero óptico cuando un sustrato simétrico forma un producto asimétrico.
6 **E** El estado de transición no es un intermedio de la reacción y no puede aislarse. Por el contrario, ha de entenderse como un estado en el cual los enlaces iniciales están parcialmente rotos y los nuevos parcialmente formados. A–D: En las condiciones experimentales adecuadas, pueden aislarse todas las otras especies.
7 **E** Sólo en la catálisis covalente está implicado un enlace covalente entre el enzima y una parte del sustrato. A-D: Todas las reacciones catalizadas enzimáticamente implican un complejo enzima–sustrato pero éste es diferente de un intermedio, el cual requiere la formación de un enlace covalente. Siempre hay, como mínimo, un estado de transición.
8 **D** La reacción D es irreversible; si no estuviese controlada, la concentración de compuesto 5 podría aumentar hasta niveles tóxicos. A: El control de la reacción A afectaría a la producción de los compuestos 3 y 6. b: La reacción B no se encuentra en la ruta directa. C,E: Las reacciones C y E son libremente reversibles por lo que no necesitan control.
9 **E** Dado que la aparición de enzimas intracelulares en el plasma proviene del escape a partir de células dañadas o destruidas, los cambios en su velocidad de síntesis dentro de la célula no tendrían que afectar la concentración plasmática. A: Esto conduciría a niveles elevados. B: Los enzimas intracelulares pueden aparecer en concentraciones anormales cuando se dañan los tejidos. C: Los ensayos de laboratorio dependen de todos los factores excepto de que la cantidad de enzima sea constante. D: Diferentes tejidos tienen distribuciones características de isozimas.
10 **D** Los inhibidores suicidas se utilizan a veces como fármacos pero no serían adecuados como mecanismo de regulación porque la inhibición es irreversible. A: La modificación covalente incluye la activación de zimógenos y las conversiones fosfo-desfosfo proteína. B: Los niveles enzimáticos están a menudo controlados por hormonas. C: La activación alostérica es frecuente. E: Los productos finales de una reacción o secuencia de reacciones pueden inhibir su propia formación mediante inhibición competitiva.
11 **A** La conversión de aldehído a ácido es una oxidación. Esta pertenece a la subclase deshidrogenasas tal como queda indicado por la presencia de NAD^+.
12 **C** La menor afinidad (K_m más elevada) hace que sea más difícil para el enzima eliminar el CH_3CHO. A: Los isozimas, por definición, catalizan la misma reacción. B: Es muy improbable que un enzima active a otro enzima. D: Con una mayor afinidad menor K_m) la reacción transcurriría a una velocidad elevada, eliminando así el CH_3CHO. E: Estos efectos se deben a una elevada concentración en el estado estacionario.
13 **B** Los ácidos generales están débilmente ionizados a pH fisiológico. El ambiente particular de la serina en la proteína facilita su capacidad de transferir un protón y por tanto de actuar como nucleófilo. A,C: Los ácidos y bases específicos no existen a pH fisiológico. D: Las bases aceptan protones. E: No existe ninguna indicación de que la serina haga eso.
14 **B** Un grupo ha de estar en el estado de ionización correcto para actuar catalíticamente. Para que un grupo histidilo pueda actuar como ácido general y base general, el pH ha de ser compatible con ambos estados de ionización de la histidina. Dado que el p*K* de la cadena lateral de la histidina es alrededor de 6,8, es

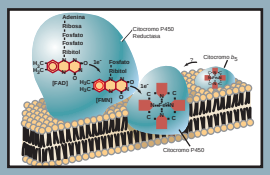
probable que la actividad máxima esté cerca de ese pH. A,C: Estos picos están fuera del margen fisiológico normal. D,E: Estas dos curvas indican que la especie está actuando sólo como ácido o como base pero no ambos.

15 La mejor manera de manipular los datos es tomando los recíprocos tanto de [S] como de *v* y construir una gráfica de Lineweaver-Burk. Debería encontrar que las dos líneas cortan el eje de ordenadas en el mismo punto y que la gráfica en presencia de A corta el eje de abscisas más cerca del origen. Este patrón indica que A es un inhibidor competitivo.

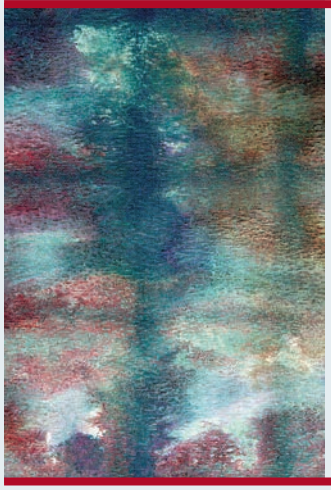
16.

	$-1/K_m$	K_m	$1/V_{max}$	V_{max}
Ausencia de A	−0,14	7,1	0,8	1,25
Presencia de A	−0,08	12,5	0,8	1,25

Con un inhibidor competitivo, V_{max} permanece constante (asegúrese de que entiende el porqué) pero la K_m aparente es mayor. Se necesita más sustrato para conseguir una velocidad determinada debido a que el sustrato ha de competir con el inhibidor.



11



LOS CITOCROMOS P450 Y LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS

Richard T. Okita
y Bettie Sue Siler Masters

11.1 VISIÓN GENERAL 466

11.2 CITOCROMO P450: CLASIFICACIÓN GENERAL Y DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN GLOBAL 466

11.3 SISTEMAS DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO DEL CITOCROMO P450 468

La NADPH–Citocromo P450 reductasa es la flavoproteína donadora de electrones en el retículo endoplasmático 468
Las NADPH–adrenodoxina reductasa es la flavoproteína donadora de electrones en las mitocondrias 469

11.4 CITOCROMO P450: NOMENCLATURA Y TERMINOLOGÍA 470

11.5 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LOS CITOCROMOS P450: FUNCIONES FISIOLÓGICAS 471

Los citocromos P450 participan en la síntesis de hormonas esteroides y en la oxigenación de compuestos endógenos 472
Los citocromos P450 oxidan los sustratos lipofílicos exógenos 476

11.6 INHIBIDORES DE LOS CITOCROMOS P450 480

11.7 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CITOCROMO P450 482

Inducción del citocromo P450 482
Polimorfismos genéticos del citocromo P450 484

11.8 OTRAS OXIGENACIONES MEDIADAS POR HEMOPROTEÍNAS Y FLAVOPROTEÍNAS: CITOCROMOS P450 SOLUBLES Y ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS 486

Tres óxido nítrico sintasas realizan diversas funciones fisiológicas 486
Aspectos estructurales de las óxido nítrico sintasas 487

BIBLIOGRAFÍA 489

PREGUNTAS 489

RESPUESTAS 491

APLICACIONES CLÍNICAS

11.1 Hiperplasia adrenal congénita: Deficiencia de CYP21A2 474
11.2 Producción de hormonas esteroides durante el embarazo 475
11.3 Papel del citocromo P450 2E1 en la toxicidad hepática inducida por paracetamol 480
11.4 Consecuencias de la inhibición del P450: Interacciones entre fármacos y efectos adversos 481
11.5 Consecuencias de la inducción de enzimas P450 484
11.6 Polimorfismos genéticos de enzimas P450 485
11.7 Aspectos clínicos de la producción de óxido nítrico 487

11.1 | VISIÓN GENERAL

El término **citocromo P450** se refiere a una familia singular de **hemoproteínas** presentes en bacterias, hongos, insectos, plantas, peces, mamíferos y primates, que pueden ser consideradas como oxigenasas universales (enzimas que utilizan oxígeno) debido a la variedad de reacciones que catalizan y a los compuestos, estructuralmente diversos, que sirven de sustrato. Las proteínas citocromo P450 están codificadas por una superfamilia génica que contiene centenares de genes. Los sustratos de estos sistemas enzimáticos incluyen compuestos sintetizados endógenamente, tales como el colesterol, hormonas esteroides y ácidos grasos, y compuestos exógenos, tales como fármacos, aditivos alimentarios, componentes del humo de cigarrillos, pesticidas y compuestos industriales que entran en el cuerpo a través de los alimentos, el aire inhalado, o de productos absorbidos por la piel.

El sistema del citocromo P450 está adquiriendo mucha importancia en medicina. Está implicado en: (1) activación o inactivación de agentes terapéuticos, (2) conversión de compuestos químicos en moléculas altamente reactivas que pueden producir lesiones celulares indeseadas, muerte celular o mutaciones, (3) producción de hormonas esteroides, (4) metabolismo de ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrienos y retinoides y (5) inhibición o inducción enzimática que produce interacciones fármaco-fármaco y efectos adversos. Las proteínas de los citocromos P450 son proteínas con un grupo hemo unido a cisteína mediante su tiolato y que tienen un mecanismo catalítico igual al de las tromboxano, prostaciclina y óxido de aleno sintasas, así como las óxido nítrico sintasas. En este capítulo se tratarán en detalle estas proteínas hemo-cisteína tiolato mediante la discusión detallada de los citocromos P450 y se presentará una introducción a las diferentes óxido nítrico sintasas.

11.2 | CITOCROMO P450: CLASIFICACIÓN GENERAL Y DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN GLOBAL

La designación de una proteína como citocromo P450 se originó a partir de sus propiedades espectroscópicas, antes de que se conociera su función catalítica. Este grupo de proteínas presentan un espectro de absorción único que se obtiene por adición de un agente reductor, tal como el hiposulfito sódico, a una suspensión de vesículas de retículo endoplasmático (microsomas) seguido del burbujeo de monóxido de carbono (CO) gas en la solución. El monóxido de carbono se une a la hemoproteína reducida y da lugar a un espectro de absorbancia con un pico aproximadamente a los 450 nm (Figura 11.1); de aquí el nombre P450 referido a un pigmento con una absorbancia a 450 nm. El CO se une al hierro del hemo, en lugar del oxígeno, con una afinidad de unión mucho mayor por lo que es un potente inhibidor de su función. Formas concretas de citocromos P450 difieren en su longitud de onda de máxima absorción dentro de un intervalo entre 446 y 452 nm.

La reacción general catalizada por un citocromo P450 se escribe como sigue:

$$NADPH + H^+ + O_2 + SH \rightarrow NADP^+ + H_2O + SOH$$

donde el sustrato (S) puede representar un esteroide, un ácido graso, un fármaco u otro compuesto químico que contenga como sustituyente un alcano, un alqueno, un anillo aromático o un anillo heterocíclico que pueda servir de sitio para la oxigenación. La reacción es una monooxigenación y el enzima es una **monooxigenasa** debido a que sólo se incorpora al sustrato uno de los dos átomos de oxígeno. En las células de mamífero, los citocromos P450 actúan como aceptores últimos de electrones en **sistemas de transporte electrónico** presentes, bien en el retículo endoplasmático, bien en la membrana mitocondrial interna. Las proteínas citocromo P450 contienen un único grupo prostético de hierro **protoporfirina IX** (véase p. 1063), que une oxígeno, y que contiene sitios de unión para el sustrato. El hierro del grupo hemo de los citocromos P450 está unido a los cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del anillo de porfirina y a dos ligandos axiales, uno de los cuales es un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína localizado cerca del extremo carboxilo de la molécula (Figura 11.2). El hierro del grupo hemo se puede presentar en dos estados de espín diferentes: (1) uno de espín bajo hexacoordinado, o (2) un estado de espín alto pentacoordinado. Los estados de espín alto y bajo son descripciones de las capas electrónicas *d* situa-

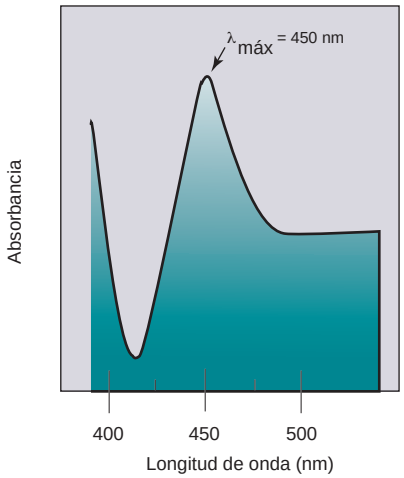


FIGURA 11.1
Espectro de absorción del citocromo P450 unido a monóxido de carbono.
La forma reducida de esta hemoproteína se une al monóxido de carbono para producir un máximo de absorción a 450 nm, aproximadamente. De ahí que este citocromo fuera designado P450.

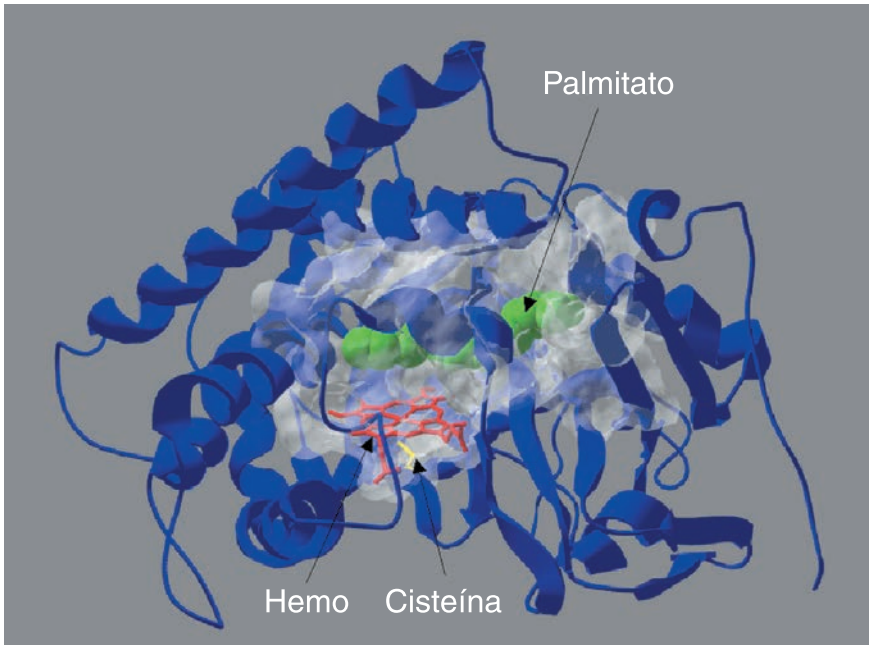


FIGURA 11.2
Modelo del sitio activo de P450 de *Bacillus megaterium* (conocido como BM3 o CYP102).
El modelo muestra el grupo prostético protoporfirina IX (rojo) con el ligando tiolato de la cisteína (amarillo) unido al hierro del hemo. El sustrato palmitato (verde) se encuentra en el sitio activo del P450. El área blanca representa el canal de sustrato del enzima.
Generado por Dawn Harris a partir de la estructura realizada por el Dr. Tom Poulos del P450BM3 (CYP102) utilizando el Glaxo Wellcome Experimental Research's Swiss Pdb Viewer. N. Guex y M.C. Peitsch. Electrophoresis 18:2714, 1997.

das alrededor del átomo de hierro. Cuando una molécula de citocromo P450 une un sustrato, se produce un cambio conformacional de la estructura proteica alrededor del átomo de hierro, de modo que se da un potencial de reducción más positivo (−170 mV) que en ausencia de sustrato (−270 mV). Se acelera así la velocidad a la cual el citocromo P450 puede ser reducido por los electrones donados por el NADPH a través del enzima flavoproteico NADPH–citocromo P450 reductasa (Figura 11.3). Para que tenga lugar la **hidroxilación (monooxigenación)**, el hierro del grupo hemo debe ser reducido desde el estado férrico (Fe^{3+}) al ferroso (Fe^{2+}), de modo que se le

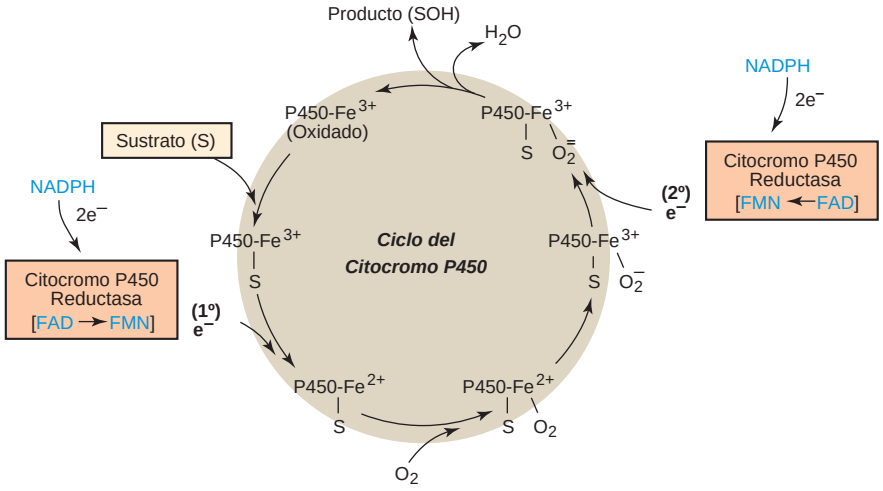


FIGURA 11.3
Secuencia de reacciones en el citocromo P450.
El diagrama muestra la unión del sustrato, la transferencia del primero y segundo electrones desde la NADPH–citocromo P450 reductasa y la unión del O_2.

pueda unir el oxígeno. Para la reacción de monooxigenación se requiere un total de dos electrones. Los electrones se transfieren a la molécula de citocromo P450 individualmente, el primero para permitir la unión del oxígeno y el segundo para romper la molécula de oxígeno y generar la especie de oxígeno activa que permita la inserción de un grupo hidroxilo en el sitio de reacción del sustrato.

11.3 | SISTEMAS DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO DEL CITOCROMO P450

Los dos electrones requeridos por la reacción de la monooxigenasa son proporcionados por el NADPH, pero un problema mecanístico básico es la facilitación de la transferencia desde el NADPH al citocromo P450. NADH y NADPH son donadores de dos electrones (véase p. 427), pero el citocromo P450, con su único grupo prostético hemo, sólo puede aceptar un electrón a la vez. De este modo, una proteína que sirva para transferir electrones desde el NADPH a la molécula de citocromo P450 ha de ser a la vez capaz de aceptar dos electrones y de actuar como donador de un electrón. Este problema se resuelve por la existencia de una flavoproteína reductasa dependiente de NADPH, que simultáneamente acepta dos electrones del NADPH pero que los transfiere individualmente, bien a una proteína ferrosulfurada intermedia (en la mitocondria), bien directamente al citocromo P450 (en el retículo endoplasmático). El grupo redox activo de la molécula de la flavoproteína es el anillo de isoaloxacina (véase p. 427). El núcleo de isoaloxacina está especialmente adaptado para llevar a cabo esta función química, ya que puede existir en los estados totalmente oxidado y reducido en 1 y 2 electrones (Figura 11.4). La transferencia de electrones desde el NADPH al citocromo P450 se lleva a cabo por dos sistemas distintos de transporte de electrones que están ubicados casi exclusivamente en las mitocondrias o en el retículo endoplasmático.

La NADPH–citocromo P450 reductasa es la flavoproteína donadora en el retículo endoplasmático

La mayoría de las proteínas citocromo P450 de mamíferos se encuentran en el retículo endoplasmático de hepatocitos, células renales y células del tracto respiratorio. En el retículo endoplasmático el NADPH dona electrones a una flavoproteína denominada **NADPH–citocromo P450 reductasa**. El enzima humano tiene una masa molecular de 76 558 Da y contiene como grupos prostéticos tanto el flavina adenina dinucleótido (FAD), como el flavina mononucleótido (FMN). Hasta la reciente caracterización de las óxido nítrico sintasas, era la única flavoproteína de mamífero conocida que contenía a la vez los grupos FAD y FMN. Un número significativo de los residuos situados en el extremo amino de la molécula son hidrofóbicos, y esta parte de la molécula está incrustada en la membrana del retículo endoplasmático (Figura 11.5). El FAD sirve como punto de entrada de electrones desde el NADPH, y el FMN les sirve como punto de salida, transfiriendo electrones individualmente al citocromo P450. Ya que la molécula de flavina puede existir en su forma reducida con 1 ó 2 electrones, y ya que se unen dos moléculas de flavina por molécula de reductasa, el enzima puede recibir electrones del NADPH y almacenarlos entre las dos moléculas de flavina antes de transferirlos individualmente al citocromo P450.

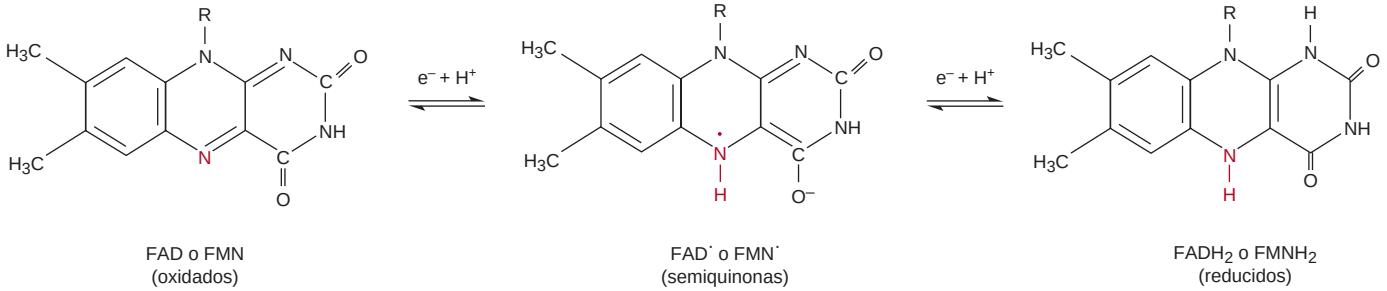


FIGURA 11.4
Anillo isoaloxacina del FMN o del FAD en sus estados oxidado, semiquinona (reducido $1e^-$), o completamente reducido (reducido $2e^-$).

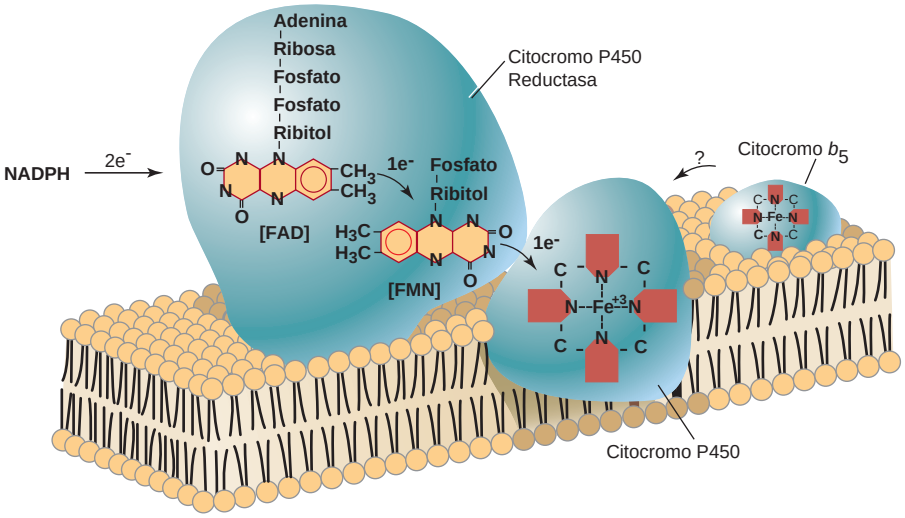


FIGURA 11.5
Componentes del sistema citocromo P450 del retículo endoplasmático (microsómico). La NADPH–citocromo P450 reductasa está unida a la membrana por su cola hidrofóbica, mientras que el citocromo P450 está profundamente incrustado en la membrana. También se muestra el citocromo b_5 que puede participar en determinadas reacciones mediadas por citocromo P450.

En determinadas reacciones catalizadas por el citocromo P450 microsómico, la transferencia del segundo electrón puede no darse directamente desde la NADPH–citocromo P450 reductasa, sino que puede producirse desde el **citocromo b_5**, una pequeña hemoproteína de masa molecular 15 199 Da. El citocromo b_5 es reducido bien por la NADPH–citocromo P450 reductasa, bien por otra flavoproteína unida al microsoma, la **NADH–citocromo b_5 reductasa**. No se conoce la razón por la que ciertas reacciones catalizadas por citocromos P450 específicos requieren, aparentemente, citocromo b_5 para la actividad enzimática óptima.

La NADPH–adrenodoxina reductasa es la flavoproteína donadora de electrones en las mitocondrias

En las mitocondrias también actúa una flavoproteína reductasa como aceptor de electrones procedentes del NADPH. Esta proteína se denomina **NADPH–adrenodoxina reductasa** debido a que sus características se describieron para la flavoproteína aislada inicialmente de la glándula adrenal. Esta proteína contiene solamente FAD, y la masa molecular de la NADPH–adrenodoxina reductasa humana es de 50 709 Da. La adrenodoxina reductasa, a diferencia de la NADPH–citocromo P450 reductasa del retículo endoplasmático, sólo está débilmente asociada con la membrana mitocondrial interna. La adrenodoxina reductasa no puede transferir directamente ni el primero ni el segundo electrón al hierro del grupo hemo del citocromo P450 (Figura 11.6). Una segunda proteína, denominada **adrenodoxina** (12 500 Da), sirve de transportador electrónico entre la adrenodoxina reductasa y el **citocromo P450 mitocondrial**. La molécula de adrenodoxina está también débilmente asociada a la membrana mitocondrial interna a través de su interacción con el citocromo P450 unido a la membrana. La adrenodoxina contiene dos **grupos ferrosulfurados** que actúan como centros redox de esta molécula y que funcionan como lanzaderas de electrones entre la adrenodoxina reductasa y los citocromos P450 mitocondriales. Una molécula de adrenodoxina recibe un electrón de su flavoproteína reductasa mitocondrial, e interacciona con una segunda adrenodoxina, la cual transfiere entonces su electrón al citocromo P450 (Figura 11.6). Los componentes del sistema citocromo P450 mitocondrial se sintetizan en el citosol en forma de precursores de mayor masa molecular, se transportan al interior de la mitocondria, y allí son modificados por proteasas dando las proteínas maduras de menor masa molecular.

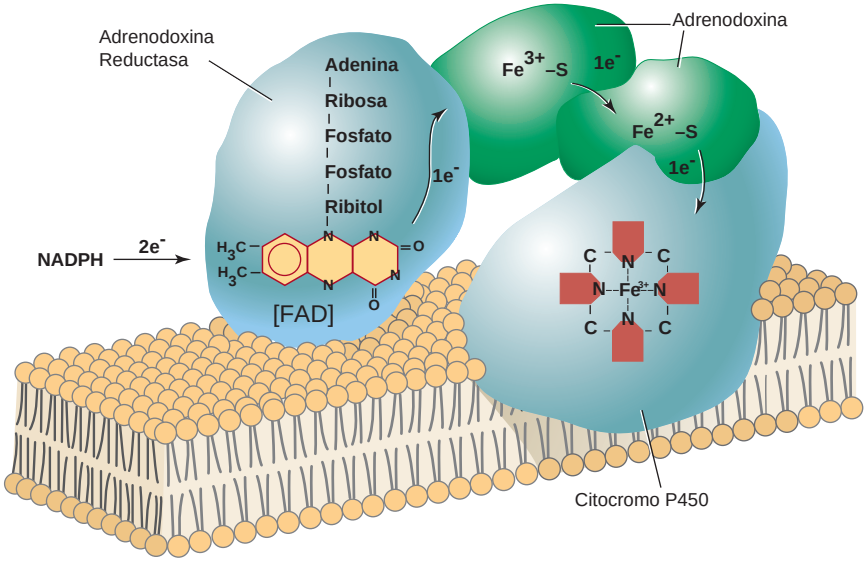


FIGURA 11.6
Componentes del sistema citocromo P450 mitocondrial.
El citocromo P450 es una proteína integral de la membrana mitocondrial interna. La NADPH–adrenodoxina reductasa y la adrenodoxina (ADR) son proteínas periféricas que no están incrustadas en la membrana.

11.4 | CITOCROMO P450: NOMENCLATURA Y TERMINOLOGÍA

Dentro de la **superfamilia** de proteínas citocromo P450 existen diversas proteínas citocromo P450 relacionadas en una misma especie que comparten, con diversos grados de similitud, secuencias de aminoácidos comunes. A medida que los investigadores empezaron a aislar diferentes formas de citocromo P450 de diversas especies entre ellas ratón, rata, conejo y hombre, se hizo patente la dificultad de discutir sobre las numerosas proteínas citocromo P450 debido a la falta de un sistema uniforme de nomenclatura. De este modo se desarrolló un sistema de clasificación en el que los citocromos P450 se identificaban según sus secuencias de aminoácidos en diversas familias y subfamilias designadas mediante números y letras, respectivamente. Las formas de citocromo P450 de una misma familia pueden metabolizar sustratos diferentes, pero están asignadas a la misma familia debido a las similitudes en la secuencia de aminoácidos. Se decidió que una **familia citocromo P450** contenga proteínas que comparten al menos un 40% de homología en la secuencia de aminoácidos y se identifica con un número arábigo. Las proteínas citocromo P450, asignadas a la misma familia, que comparten al menos el 55% de homología de secuencia se clasifican además dentro de una **subfamilia** y se les asigna una letra mayúscula. Así, las formas de citocromo P450 que se designan 2A, 2B, 2C representan proteínas citocromo P450 que comparten al menos 40% de homología de secuencia para ser clasificadas en la familia 2. Las proteínas citocromo P450 que comparten 55-99% de homología se agrupan seguidamente en subfamilias que se identifican mediante una letra mayúscula. Las formas de citocromo P450 de la misma subfamilia pueden proceder de especies diferentes. Finalmente, para identificar proteínas citocromo P450 concretas dentro de una subfamilia, se le asigna a la proteína un segundo número, por ejemplo, 2A1, 2A2 o 2A3. El término **CYP**, que representa las dos primeras letras de la palabra inglesa para citocromo (**cy**tochrome) y la primera letra en P450 se ha designado como prefijo para un gen o proteína citocromo P450. Así, los citocromos P450 1A2 y P450 2D6 se abrevian CYP1A2 y CYP2D6 en este sistema de nomenclatura. Durante un cierto tiempo se utilizó el término CYP para designar el gen mientras que P450 se refería a la proteína, pero en la actualidad es frecuente el uso indistinto de las designaciones P450 y CYP para identificar tanto al gen como a la proteína. En la Tabla 11.1 se presenta una lista de diversas formas de P450 humanas.

Con ciertas formas de citocromo P450, las reglas de nomenclatura se han modificado y existe un único identificador, por ejemplo CYP2E1, para describir las proteínas que están en una subfamilia CYP particular, a pesar de que se encuentran secuencias génicas distintas para estas proteínas citocromo P450 en diferentes especies. La explicación es que, aunque existen diferentes secuencias de aminoácidos en diversas especies, la reacción o reacciones catalizadas en esta subfamilia son similares y comparten sustratos comunes a través de las distintas especies. Además, existen enzi-

TABLA 11.1 Formas humanas principales del citocromo P450

CYP1	*CYP2*	*CYP3*	*CYP4*	*CYP11*	*CYP17*	*CYP19*	*CYP21*	*CYP26*	*CYP51*
1A1	2A6	3A4	4A11	11A1	17[a]	19[a]	21A2	26A1	51[a]
1A2	2A7	3A5	4B1	11B1				26B1	
1B1	2A13	3A7	4F2	11B2					
	2B6		4F3						
	2C8		4F8						
	2C9								
	2C18								
	2C19								
	2D6								
	2E1								
	2J2								

[a]Las formas de P450 en estas subfamilias se designan solamente con un número porque sólo existe un produco génico.

mas citocromo P450 en una familia citocromo P450 simple que se identifican con un único número, por ejemplo CYP17 o CYP19. Estas proteínas citocromo P450 catalizan una reacción distinta con sustratos esteroides específicos; el número designa el átomo de carbono específico de la molécula de esteroide que es hidroxilado.

Aunque los citocromos P450 son enzimas, los términos isoenzima o isozima no se utilizan generalmente para describir estas proteínas relacionadas. Se han utilizado los términos "forma" o "isoforma" para describir proteínas citocromo P450 relacionadas.

11.5 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LOS CITOCROMOS P450: FUNCIONES FISIOLÓGICAS

Los citocromos P450 metabolizan diversos compuestos lipofílicos de origen exógeno o endógeno. Estos enzimas pueden catalizar la **hidroxilación** del átomo de carbono de un grupo metilo, el carbono metilénico de un alcano, la hidroxilación de un anillo aromático para formar un fenol, o la adición de un átomo de oxígeno sobre un doble enlace para formar un **epóxido**. Las reacciones catalizadas por formas del citocromo P450 se muestran en la Figura 11.7. Las proteínas citocromo P450 también catalizan reacciones de **desalquilación**, en las que se elimina un grupo alquilo unido a un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre. Los citocromo P450 también catalizan la **oxidación** de átomos de nitrógeno, azufre y fósforo, así como reacciones de **deshalogenación**.

Es importante caracterizar los sustratos que metabolizan formas concretas de citocromo P450. Esto es esencial para los investigadores que caracterizan las formas de citocromo P450 humanas porque necesitan determinar cómo se metabolizan los fármacos y saber si las formas de citocromo P450 pueden ser inhibidas por diferentes compuestos. El proceso de aprobación de un medicamento por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) exige la presentación de información detallada sobre el metabolismo de los medicamentos antes de su aprobación final para uso general en humanos. Una manera de determinar la especificidad de sustrato de una determinada proteína citocromo P450 humana consiste en expresar, mediante técnicas de DNA recombinante, el cDNA de la proteína en cuestión en un sistema celular de expresión apropiado. Esto se ha conseguido en sistemas celulares de bacterias, insectos, levaduras y mamíferos, y ha permitido la determinación inequívoca de la especificidad de sustrato. Se supone que, si se puede determinar la secuencia de nucleótidos de los genes expresados, entonces casi no habrá duda acerca del origen de la actividad enzimática expresada en esas células. La capacidad de expresar formas recombinantes de citocromo P450 ha permitido extensos estudios *in vitro* para caracterizar la especificidad de sustrato de un citocromo P450 determinado y su inhibición por diversos compuestos. Los estudios *in vitro* con proteínas citocromo P450 humanas recombinantes expresadas permitirán identificar qué forma o formas de citocromo P450 catalizan el metabolismo de un fármaco en estudio, qué producto o productos se forman, si el fármaco estudiado inhibe el metabolismo de otros fármacos o si otros fármacos pueden reducir o estimular el metabolismo del fármaco en estudio.

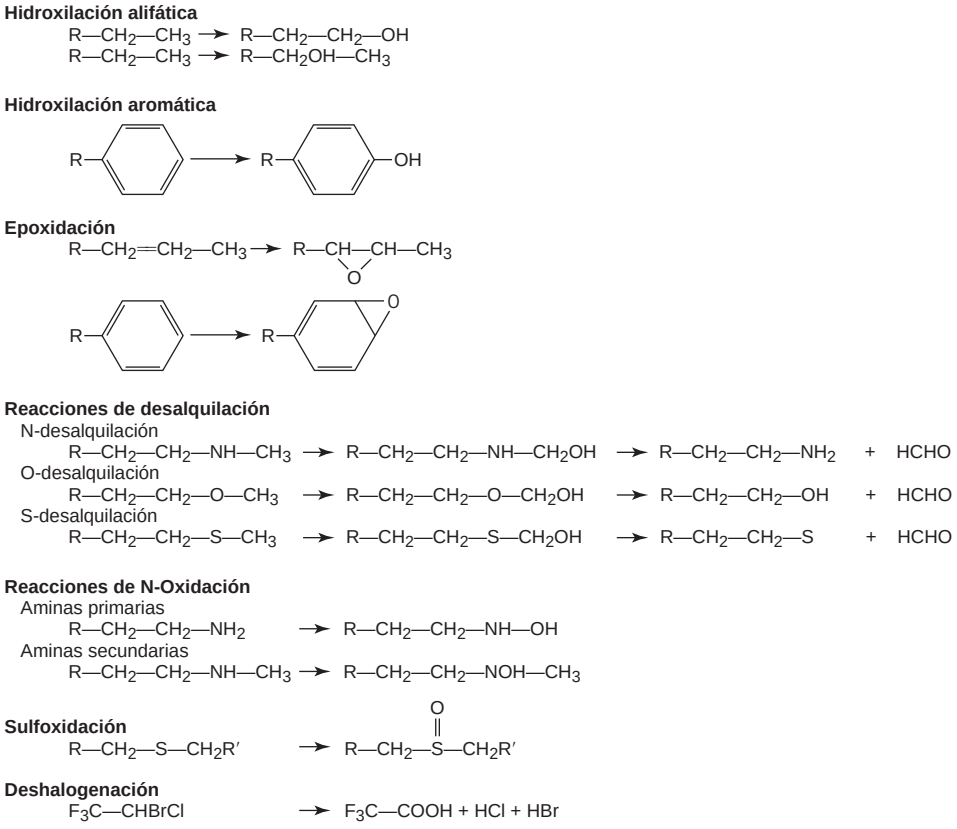


FIGURA 11.7
Tipos de reacciones comunes catalizadas por citocromos P450.

Los citocromos P450 participan en la síntesis de hormonas esteroides y en la oxigenación de compuestos endógenos

Un ejemplo de la importancia de las reacciones catalizadas por el citocromo P450 es la síntesis de **hormonas esteroides** a partir de colesterol en la **corteza adrenal** y en los órganos sexuales. Los citocromos P450 mitocondrial y del retículo endoplasmático son necesarios para convertir el colesterol en aldosterona y cortisol, en la corteza adrenal; en **testosterona** en los testículos; y en **estradiol** en los ovarios. Formas de citocromo P450 son responsables de varias etapas en la síntesis adrenal de **aldosterona**, el mineralocorticoide encargado de la regulación del equilibrio hídrico y salino, y de **cortisol**, el glucocorticoide que gobierna el metabolismo de proteínas, glúcidos y lípidos. Además, los citocromos P450 adrenales catalizan la síntesis de pequeñas cantidades del andrógeno **androstenodiona**, regulador de características sexuales secundarias y precursor de estrógenos y de testosterona. En la Figura 11.8 se presenta un resumen de estas rutas.

En las mitocondrias adrenales, un citocromo P450 (CYP11A1) cataliza la reacción de la **rotura de la cadena lateral**, convirtiendo el colesterol en pregnenolona, una etapa comprometida en la síntesis de esteroides. La eliminación del aldehído isocaproico es el resultado de una hidroxilación secuencial de los átomos C-22 y C-20 para formar 22-hidroxicolesterol y a continuación 20,22-dihidroxicolesterol, respectivamente (Figura 11.9). Para romper el enlace entre los átomos de carbono 20 y 22 y formar pregnenolona, esteroide de 21 carbonos, es necesaria una etapa adicional catalizada por un citocromo P450. Esta secuencia de reacciones requiere 3 moléculas de NADPH y 3 moléculas de O_2 y está catalizada por un único enzima citocromo P450, el CYP11A1. Se producen dos intermedios que permanecen en el sitio activo hasta que se forma el producto final, la **pregnenolona**. Una vez producida en las mitocondrias, la pregnenolona se transporta al citosol, donde se metaboliza a **progesterona** por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/$\Delta^{4,5}$-isomerasa. La progesterona es metabolizada a **desoxicorticosterona (DOC)** por un citocromo P450 del retículo endoplasmático (CYP21), que cataliza la reacción de 21-hidroxilación. La DOC es hidroxilada en el carbono 11 por un citocromo P450 (CYP11B1) mitocondrial for-

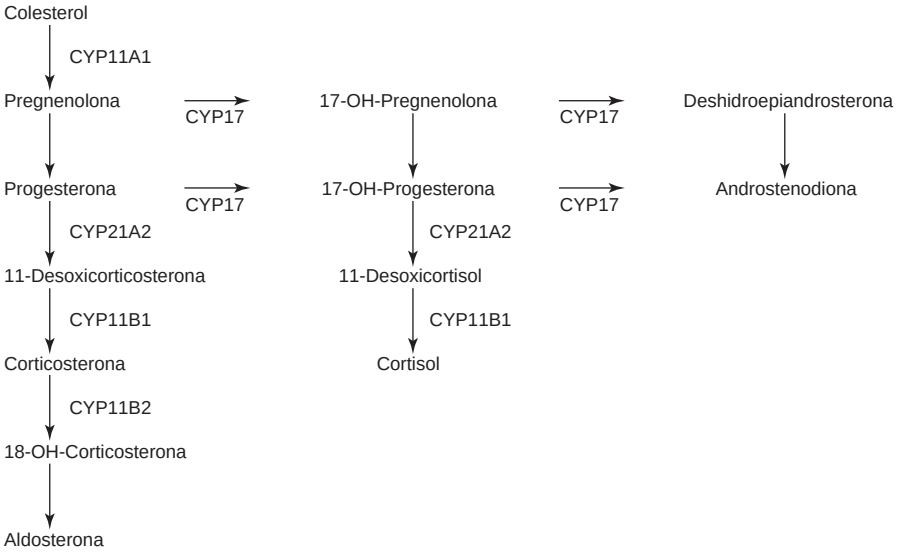


FIGURA 11.8
Síntesis de hormonas esteroides en la glándula adrenal.
Las reacciones catalizadas por los citocromos P450 (CYP) están indicadas.

mando **corticosterona**, que a continuación es hidroxilada por otro enzima citocromo P450 mitocondrial, el CYP11B2, en el carbono 18 para formar aldosterona, un mineralocorticoide (véase p. 967). Aunque se señaló antes que las formas de citocromo P450 que hidroxilan esteroides reciben designaciones CYP que identifican el átomo de carbono que es hidroxilado, existen excepciones a este proceso tal como se ha notado en el caso de CYP11A1 y CYP11B2, que catalizan reacciones de hidroxilación en posiciones que no son el átomo de carbono 11.

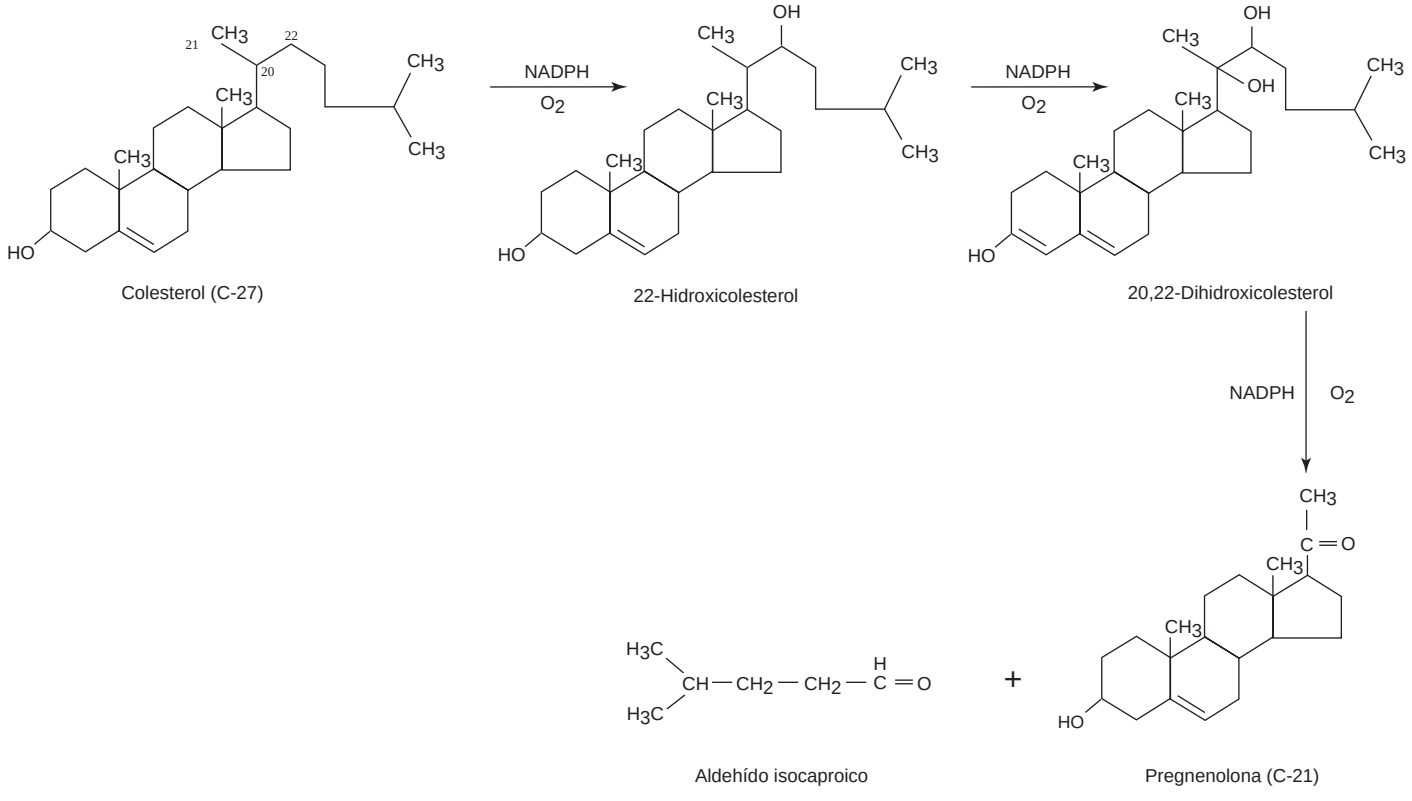
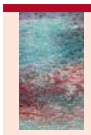


FIGURA 11.9
Reacción de rotura de la cadena lateral del colesterol.
El citocromo P450 cataliza tres reacciones secuenciales para producir pregnenolona y aldehído isocaproico.

La síntesis de cortisol se produce tanto a partir de pregnenolona como de progesterona, e implica un citocromo P450 (CYP17) del retículo endoplasmático, que cataliza la reacción de 17α-hidroxilación. La hidroxilación del C-21 de la 17α-hidroxiprogesterona por el CYP21 produce **11-desoxicortisol**, que es transportado al interior de la mitocondria, donde es hidroxilado en el átomo de carbono 11 por el CYP11B1 para formar cortisol. En la Apli. Clín. 11.1 se discuten las deficiencias congénitas resultantes de mutaciones en el gen que codifica el CYP21.

La síntesis de esteroides que contienen 19 átomos de carbono a partir de los precursores **17α-hidroxipregnenolona** o **17α-hidroxiprogesterona** es el resultado de la eliminación del grupo acetilo del C-17. Esta reacción está catalizada también por el CYP17, identificado como el mismo citocromo P450 que hidroxila los esteroides en C-17. No se conocen aún los factores que determinan si este citocromo P450 lleva a cabo una única etapa de hidroxilación para dar el producto 17-OH, o si va más allá y rompe el enlace carbono–carbono 17–20, aunque se demostró que la presencia del citocromo b_5 en los tejidos gonadales llevaba al enzima CYP17 a catalizar la reacción de rotura. Los productos que se forman al eliminar el grupo acetilo son **deshidroepiandrosterona (DHEA)** a partir de 17α-hidroxipregnenolona, o **androstenodiona** a partir de 17α-hidroxiprogesterona. La DHEA puede deshidrogenarse en el grupo 3-OH a androstenodiona, un potente esteroide androgénico que sirve de precursor inmediato de la testosterona.

Otra reacción fisiológicamente importante catalizada por citocromos P450 es la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos, denominada **aromatización**, ya que se produce un anillo aromático en el anillo A del producto esteroide. En esta reacción compleja, no muy distinta de la rotura de la cadena lateral del colesterol, en la que un mismo enzima citocromo P450 lleva a cabo múltiples reacciones de hidroxilación para la formación del anillo aromático y la eliminación del grupo metilo en C-19. En la Figura 11.10 se resume la reacción de aromatización. Dos reacciones de hidroxilación secuenciales en el átomo de carbono metílico C-19 introducen un grupo aldehído. El paso final podría implicar un ataque peroxidativo en el carbono 19, con pérdida del grupo metilo y eliminación del átomo de hidrógeno para producir el anillo aromático. Las tres reacciones de hidroxilación están catalizadas por el mismo citocromo P450, y el enzima se denomina **aromatasa** o $P450_{arom}$ que es un miembro de la subfamilia CYP19. La complejidad de la producción de hormonas esteroides durante el embarazo y el papel de los citocromos P450 se ilustran en la Apli. Clín. 11.2.



APLICACIÓN CLÍNICA 11.1
Hiperplasia adrenal congénita: Deficiencia de CYP21A2

La corteza adrenal es un sitio principal de producción de hormonas esteroides durante la vida fetal y adulta. La glándula adrenal es metabólicamente más activa en la vida fetal; puede producir 100–200 mg de esteroides por día en comparación con los 20–30 mg producidos en la glándula adrenal adulta no estresada. Se han descrito deficiencias enzimáticas en todas las etapas de la producción de cortisol. Las enfermedades asociadas con una producción insuficiente de cortisol se denominan hiperplasias adrenales congénitas (CAH). La deficiencia enzimática más común en las CAH es la de 21-hidroxilasa o CYP21A2 que impide la metabolización de 17α-hidroxiprogesterona a 11-desoxicortisol y su conversión en cortisol. Ello provoca un aumento en la secreción de ACTH, la hormona hipofisaria que regula la producción de cortisol en la corteza adrenal. Períodos largos con niveles altos de ACTH dan lugar a hiperplasia adrenal y a un aumento en la producción de las hormonas androgénicas deshidroepiandrosterona (DHEA) y androstenodiona. Los problemas clínicos surgen porque la producción adicional de esteroides androgénicos dan lugar a virilización en las hembras, desarrollo precoz de los órganos sexuales en machos prepúberes, o enfermedades relacionadas con un desequilibrio salino causado por la disminución en los niveles de aldosterona.

Las consecuencias clínicas de una deficiencia grave de 21-hidroxilasa se pueden detectar en el nacimiento, especialmente en hembras, ya que la cantidad excesiva de esteroides androgénicos puede dar lugar a un evidente desarrollo irregular de los genitales. En machos recién nacidos puede no detectarse una deficiencia en la actividad de la 21-hidroxilasa, ya que la apariencia de los genitales será normal, si bien existirá una masculinización y un desarrollo físico precoces. En una aparición tardía de las CAH, los individuos nacen sin signos evidentes de exposición prenatal a unos niveles de andrógenos excesivos, y los síntomas clínicos pueden variar considerablemente entre un desarrollo temprano del vello púbico, fusión temprana de las placas de crecimiento epifisales, dando lugar a una interrupción prematura del crecimiento, o patrones de alopecia masculina en hembras.

Donohoue, P. A., Parker, K. y Migeon, C. J. Congenital adrenal hyperplasia. En: C. S. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. Vol. II, New York; McGraw-Hill, 1995, Chap. 94, p. 2929; White, P. C. y Speiser, P. W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Rev.* 21:245, 2000.

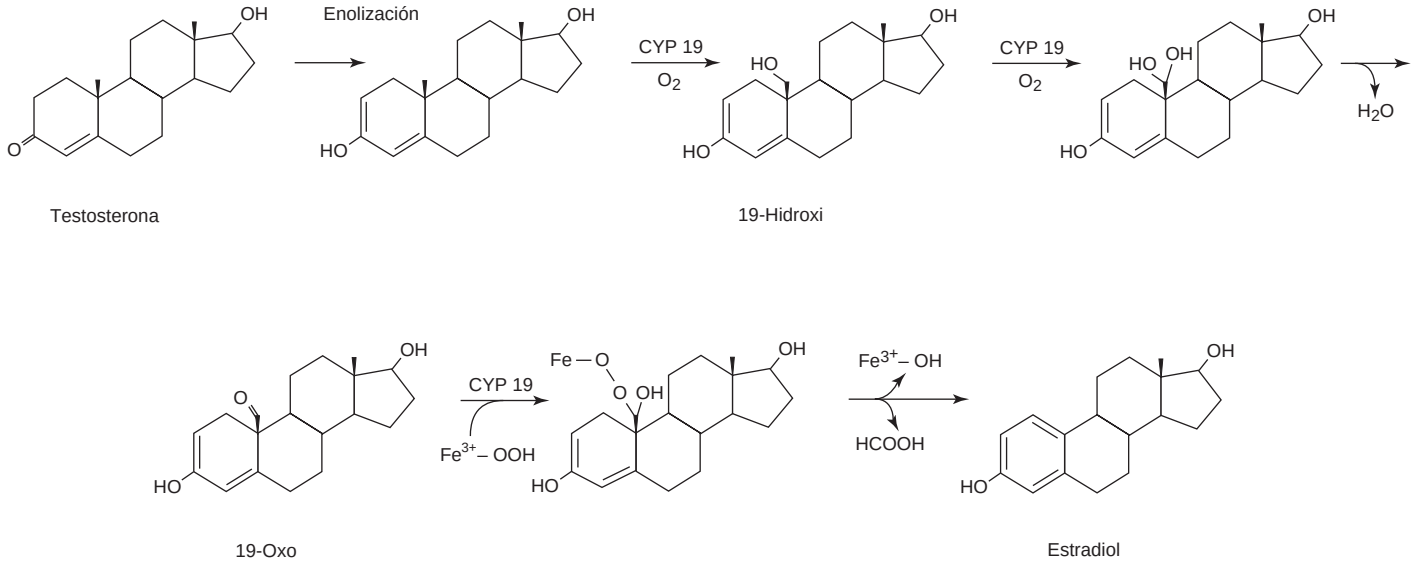
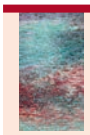


FIGURA 11.10
Secuencia de reacciones que conducen a la aromatización de andrógenos a estrógenos.
Adaptado de Graham-Lorence, S., Amarneh, B., White R. E., Peterson, J. A. y Simpson E. R. A three dimensional model of aromatase cytochrome P450. Protein Sci. *4:1065, 1995.*

Otras formas de citocromo P450 también metabolizan otros compuestos endógenos y son importantes en la regulación de su actividad. Por ejemplo, CYP27B1 cataliza la 1-hidroxilación de la **25-hidroxivitamina D_3** para dar el metabolito 1,25-dihidroxi que es la forma activa de esta importante hormona (véase p. 1141). El **leucotrieno** B_4 es un quimiotáctico de los leucocitos polimorfonucleares que es hidroxilado por CYP4F3 para dar la forma menos activa, el 20-hidroxileucotrieno B_4. El **ácido araquidónico** es sustrato de CYP2J2, CYP2B6 y CYP4A11 y es metabolizado a diversos derivados epóxidos, hidroxi y dihidroxi que pueden tener impor-



APLICACIÓN CLÍNICA 11.2
Producción de hormonas esteroides durante el embarazo

Las formas del citocromo P450 juegan un papel principal en la síntesis de estrógenos tal como se describe en el texto. Durante el embarazo se necesita una interacción singular entre formas de citocromo P450 en diferentes órganos para sintetizar las grandes cantidades requeridas. La producción de hormonas esteroides aumenta de manera espectacular durante el embarazo; al término del mismo la mujer embarazada produce 15–20 mg de estradiol, 50–100 mg de estriol y aproximadamente 250 mg de progesterona cada 24 horas. La cantidad de estrógenos sintetizados durante el embarazo supera con mucho la cantidad sintetizada por la mujer no embarazada. Por ejemplo, al final de la gestación, la mujer embarazada produce en 24 horas mil veces más estrógenos que las mujeres premenopáusicas.

El cuerpo lúteo del ovario es el sitio principal de producción de estrógenos durante las primeras semanas de gestación, pero, aproximadamente a las cuatro semanas, la placenta empieza a sintetizar y secretar progesterona y estrógenos. Después de 8 semanas de gestación, la placenta se convierte en la fuente predominante de síntesis de progesterona. Una diferencia interesante entre los sistemas de hidroxilación de esteroides de la placenta y los del ovario es que a la placenta humana le falta el citocromo P450 (CYP17), que cataliza la reacción de 17α-hidroxilación y la rotura del enlace carbono–carbono 17–20 (véase p. 963 para detalles de la síntesis de hormonas esteroides). De este modo, la placenta no puede sintetizar estrógenos a partir de colesterol. La placenta cataliza la reacción de rotura de la cadena lateral para formar pregnenolona a partir de colesterol y oxida la pregnenolona a progesterona, pero libera esta hormona a la circulación materna. Entonces, ¿cómo produce estrógenos la placenta si no puede sintetizar DHEA o androstenodiona a partir de progesterona? Esto último tiene lugar en la glándula adrenal del feto, un órgano esteroidogénico muy activo durante la vida fetal, que cataliza la síntesis de DHEA a partir de colesterol y la libera a la circulación fetal. Una gran proporción de DHEA fetal es metabolizada por la glándula adrenal y por el hígado fetales a 16α-OH-DHEA, y este producto es convertido en la placenta en el estrógeno estriol mediante el CYP19 (o CYP_{arom}). Ésta es una demostración elegante de la cooperatividad de los sistemas de hidroxilación mediados por citocromo P450 en los sistemas de órganos fetal y materno, cooperatividad que conduce a la formación progresiva de estrógenos durante el desarrollo del feto humano en la gestación.

Cunningham, F. G., MacDonald, P. C., Gant, N. F., Leveno, K. J., Gilstrap, L. C, Hankins, G. D. V. y Clark, S. L. The placental hormones. En: *Williams Obstetrics,* 20th ed. East Norwalk, CT: Appleton and Lange, 1997, Chap. 6, p. 125.

tantes funciones reguladoras (véase p. 766). El **ácido retinoico** es metabolizado por CYP26A1 al derivado 4-hidroxi, que podría tener mayor actividad en ciertos tejidos que el ácido retinoico.

Los citocromos P450 oxidan sustratos lipofílicos exógenos

Los **sustratos exógenos** denominanados a menudo **xenobióticos**, que significa "extraño a la vida", son importantes sustratos de formas de citocromo P450. Entre ellos se incluyen fármacos terapéuticos, productos químicos utilizados en el lugar de trabajo, subproductos industriales que se convierten en contaminantes ambientales y aditivos de alimentos. Los citocromos P450 son capaces de oxidar diversos xenobióticos, especialmente compuestos lipofílicos. La adición de un grupo OH hace que el compuesto sea más polar y por consiguiente más soluble en el ambiente acuoso de la célula. Muchos compuestos exógenos son muy lipofílicos y se acumulan con el tiempo en el interior de las células, interfiriendo en la función celular. En las Tablas 11.2 y 11.3 se presentan ejemplos de xenobióticos que son oxidados por citocromos P450. En muchos casos la acción de los citocromos P450 da lugar a un compuesto con actividad farmacológica reducida que puede ser fácilmente excretado en la orina o las heces. Se considera que el CYP3A4 metaboliza aproximadamente el 50% de los fármacos terapéuticos, CYP2D6 aproximadamente el 20%, CYP2C9 y CYP2C19 aproximadamente el 15%; el restante 15% de los fármacos son metabolizados por CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6 y otras formas de P450. Debe observarse que debido a que las formas de P450 tienen un especificidad de sustrato muy amplia, un compuesto puede ser metabolizado *in vivo* por más de una forma de citocromo P450 y en diferentes sitios de la molécula, tal como se muestra en la Figura 11.11 para el compuesto diazepam. Si un sustrato es metabolizado por más de un P450, los productos formados en diversos individuos pueden ser diferentes debido a que pueden existir diferentes cantidades de las proteínas expresadas y las formas de citocromo P450 pueden diferir en sus valores de K_m y V_{max}.

Los xenobióticos también pueden ser modificados por una serie de sistemas enzimáticos de conjugación, que forman productos no tóxicos y que se pueden eliminar fácilmente del cuerpo. En la Tabla 11.3 se presenta una lista de enzimas que metabolizan xenobióticos. Muchos de estos enzimas, incluidos los que catalizan reacciones de conjugación, se encuentran principalmente en el hígado.

Un ejemplo de xenobiótico cuyo metabolismo ha recibido considerable atención es el **benzo[*a*]pireno**, un contaminante ambiental común que se produce en la combustión del carbón, en la combustión de los materiales del tabaco, en los alimentos cocinados en barbacoas con carbón de leña y como un subproducto in-

TABLA 11.2 Tipos de reacciones catalizadas por citocromos P450

Reacción	*Ejemplo*
Hidroxilación de alifáticos	Hidroxilación de ibuprofeno y su cadena lateral alquílica
Hidroxilación de aromáticos	Hidroxilación de *S*-warfarina
N-Hidroxilación	Hidroxilación de aminoglutetimida a su *N*-hidroxiderivado
Epoxidación	Metabolismo de aflatoxina B_1 a su derivado epóxido, un carcinógeno hepático
Desalquilación sobre oxígeno y nitrógeno	*O*-desmetilación de codeína a morfina, su agente analgésico activo
	N-desmetilación del diazepam (Valium) a nordazepam
Desaminación oxidativa	Eliminación del grupo amino de la anfetamina para formar fenilacetona
Oxidación de fósforo	Oxidación del malatión, un insecticida, a malaoxón, su agente activo
Oxidación de azufre	Oxidación de cimetidina (Tagamet) a su derivado sulfóxido
Deshalogenación	Desclorinación del disolvente tetracloruro de carbono (CCl_4) para formar el radical CCl_3
Deshidrogenación	Metabolismo del etanol (CH_3CH_2OH) a acetaldehído (CH_3CHO)

TABLA 11.3 Ejemplos de reacciones y de enzimas para el metabolismo de xenobióticos

Tipo de reacción	*Nombre general del enzima*	*Reacción enzimática general*
Oxidación	Deshidrogenasas	Oxidación de grupos alcohol o aldehído
	Monooxigenasas que contienen flavina (FMO)	Oxidación de aminas primarias, secundarias y terciarias, nitronas, tioéteres, tiocarbamatos y fosfinas.
	Monoaminooxidasas	Eliminación de una amina por desaminación oxidativa
	Citocromo P450	Véase la Tabla 11.2 y la Figura 11.7 para las reacciones catalizadas por enzimas P450
Reducción	Aledhído y cetona reductasas	Reducción de un grupo carbonilo a grupo hidroxilo
	Azorreductasas	Reducción de un grupo azo para formar aminas primarias
	Quinona reductasas	Reducción de quinonas a hidroquinonas
Hidrólisis	Epóxido hidrolasas	Adición de agua a un grupo óxido areno o epóxido para formar grupos hidroxi vecinos
	Carboxilesterasas	Adición de agua a un enlace éster
	Amidasas	Adición de agua a un enlace amida
Conjugación	*N*-acetiltransferasas	Adición de CoA a partir de acetil-CoA a aminas aromáticas o compuestos que contienen hidrazinas
	UDP–glucuronosil transferasas	Adición de ácido glucurónico desde la uridina-5′-difosfato (UDP)-ácido glucurónico a grupos carboxilo, hidroxilos fenólicos y alifáticos, aminas aromáticas o alifáticas, o sulfhidrilo
	Sulfotransferasas	Adición de grupos sulfato desde el fosfoadenosil fosfosulfato (PAPS) a grupos fenólicos, alcoholes alifáticos o aminas aromáticas
	Metiltransferasas	Adición de grupos metilo desde la *S*-adenosilmetionina a compuestos que contienen grupos fenol, catecol, aminas alifáticas o aromáticas o sulfhidrilo
	Glutatión *S*-transferasa	Conjugación de compuestos que contienen heteroátomos electrofílicos, iones nitrenio, iones carbonio, radicales libres, grupos epóxido u óxido de areno

dustrial. El benzo[*a*]pireno, que es un carcinógeno débil, se metaboliza dando un producto que es un potente carcinógeno en animales y un mutágeno en bacterias, lo cual ha impulsado un considerable esfuerzo hacia la identificación de los enzimas implicados en este proceso. El benzo[*a*]pireno es metabolizado por P450 1A1, 1A2 y 1B1. El benzo[*a*]pireno también se une al **receptor de hidrocarburos arílicos (AhR)** e induce estas formas de P450 aumentando de este modo su propio metabolismo. El producto identificado como **carcinógeno** final es el **benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido**, cuya formación se ilustra en la Figura 11.12. Las reacciones incluyen una epoxidación catalizada por citocromo P450 en la posición 7,8, seguida de hidrólisis por una **epóxido hidrolasa** que da el compuesto hidroxilado relacionado, benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol, y seguida a continuación por una segunda reacción de epoxidación para formar benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido. Se ha demostrado que este último metabolito forma aductos de guanina que son capaces de alterar la función génica, lo que conduce a mutaciones. La acción del benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido sobre el gen *p*53 fue un paso crucial en el conocimiento del mecanismo por el que el benzo[*a*]pireno, com-

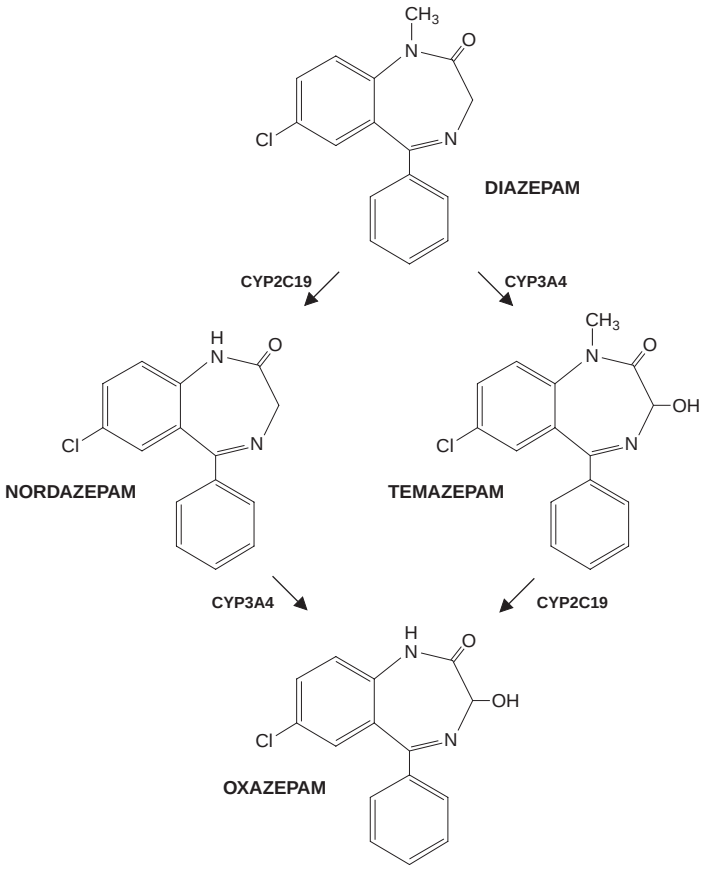


FIGURA 11.11
Metabolismo del diazepam por los citocromos P450 3A4 y 2C19. El diazepam puede ser metabolizado por más de un P450. Los metabolitos que se forman a partir de un compuesto se verán afectados por la cantidad de la forma de P450 que se expresa en los tejidos.

puesto presente en el **humo de los cigarrillos**, es un carcinógeno en el hombre. La elucidación de la ruta metabólica del benzo[*a*]pireno jugó un papel clave en el conocimiento de cómo ejerce sus efectos tóxicos sobre las células.

El metabolismo del agente analgésico común **paracetamol** constituye otro ejemplo de la conversión de un xenobiótico en un metabolito tóxico. El metabolismo del paracetamol demuestra el papel complejo que el P450 y otros enzimas

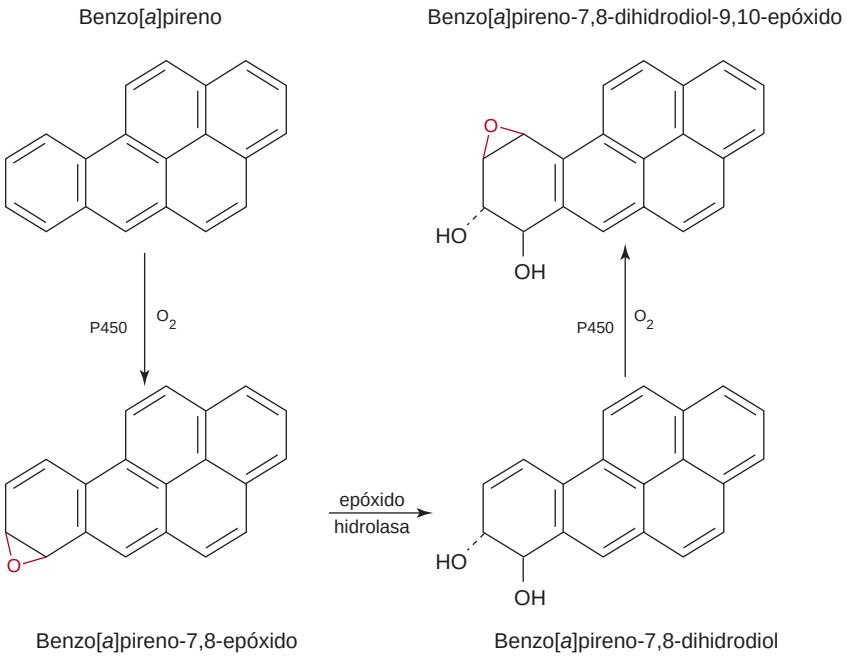


FIGURA 11.12
Metabolismo del benzo[a]pireno por el citocromo P450 y la epóxido hidrolasa para formar benzo[a]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido.

metabolizadores de fármacos juegan en la toxicidad inducida por fármacos. Normalmente el paracetamol se metaboliza principalmente mediante rutas de sulfatación y glucuronidación a conjugados polares inactivos que se excretan fácilmente (Figura 11.13). El paracetamol también es metabolizado por CYP2E1 a un intermedio altamente reactivo, el *N*-acetil-*p*-benzoquinonimina (NAPQI). La cantidad de paracetamol metabolizada por el CYP2E1 es normalmente baja en comparación con la sulfatación o glucuronidación. Cuando se forman pequeñas cantidades de NAPQI, se conjugan rápidamente con el glutatión (véase p. 818) para dar un metabolito no tóxico. Sin embargo, si el glutatión se agota, el NAPQI se escapará de la conjugación con glutatión y reaccionará con componentes celulares del hígado y producirá lesiones celulares. Normalmente, los niveles de CYP2E1 presentes son bajos en comparación con otras formas de P450, por lo que la producción de NAPQI cuando se toman dosis normales de paracetamol es baja. No obstante, cuando un individuo toma grandes cantidades de paracetamol, se produce un incremento en la cantidad de NAPQI que puede causar lesión hepática grave. Otro factor en la toxicidad hepática inducida por el paracetamol es que el consumo de bebidas alcohólicas induce el CYP2E1, lo que aumenta la producción de NAPQI. No obstante, el **alcohol**, también es sustrato de este citocromo P450, por lo que inhibe el metabolismo de otros sustratos de CYP2E1. La extensión de la lesión hepática depende del momento y cantidad de paracetamol tomado. En la Apli. Clín. 11.3 se describen los efectos del alcohol sobre el metabolismo del paracetamol.

Tal como lo muestran los casos del benzo[*a*]pireno y del paracetamol, el sistema P450 puede producir metabolitos tóxicos. La formación de compuestos tóxicos por el citocromo P450 no significa, sin embargo, que se haya de producir una lesión celular o un tumor. Otros procesos celulares determinan la extensión de la lesión celular. Por ejemplo, se demostró que la conjugación del benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido por **glutatión transferasas** juega un papel protector clave en la

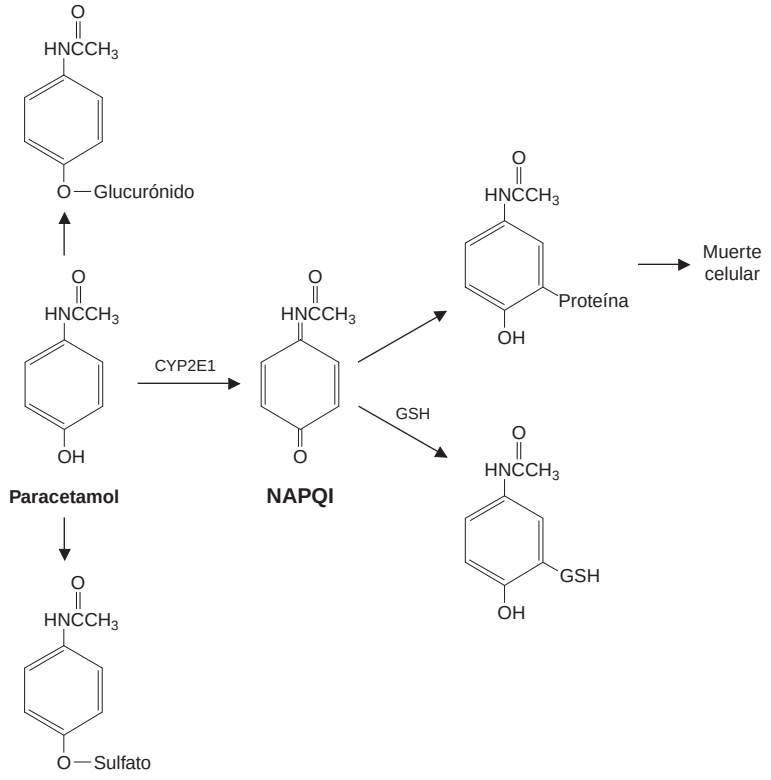
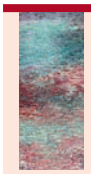


FIGURA 11.13
El paracetamol puede ser metabolizado por los enzimas de fase II, sulfotransferasa y glucuronosiltransferasa y por CYP2E1.
Metabolismo por CYP2E1 conduce a la formación de *N*-acetil-*p*-benzoquinonimina (NAPQ1). Cuando la formación de NAPQ1 es baja, el NAPQ1 se puede conjugar con el glutatión (GSH) para dar un metabolito no tóxico; sin embargo, si se forma NAPQ1 en cantidades excesivas puede escapar a la conjugación con el glutatión y reaccionar con componentes celulares del hígado y producir lesión celular.



APLICACIÓN CLÍNICA 11.3

Papel del citocromo P450 2E1 en la toxicidad hepática inducida por paracetamol

En la toxicidad hepática inducida por el paracetamol intervienen múltiples factores. En la Figura 11.13 se muestra la ruta del metabolismo del paracetamol. Una incidencia que tiene un efecto profundo sobre el metabolismo del paracetamol es el consumo de alcohol que es tanto inductor como sustrato del CYP2E1. En estudios en los que individuos consumen una cantidad de alcohol equivalente a una botella de vino de 750 ml, seis latas de cerveza de unos 330 ml o 100 ml de licor destilado durante un período de 6-7 horas existe un incremento del 22% en el metabolismo del paracetamol a través del CYP2E1. Este incremento en el metabolismo del paracetamol a través del CYP2E1 sólo se observó cuando se dio el paracetamol varias horas después del consumo de alcohol. El tiempo entre la administración de paracetamol y la última consumición de alcohol puede ser muy crítica en el desarrollo de la lesión hepática inducida por paracetamol. En una persona que está bebiendo alcohol, el metabolismo del paracetamol por el CYP2E1 está retrasado porque el etanol es también sustrato del CYP2E1 y compite con otros sustratos del CYP2E1 tales como el paracetamol. En el consumo crónico de alcohol, se induce un nivel elevado de CYP2E1 y se producen cantidades superiores de *N*-acetil-*p*-benzoquinonimina (NAPQI); sin embargo, el alcohol consumido puede proteger, de hecho, a los bebedores de la lesión hepática inducida por paracetamol si toman el fármaco al mismo tiempo que el alcohol o poco tiempo después. Si toman el paracetamol varias horas después de haber parado de beber, los niveles aumentados de CYP2E1 pueden metabolizar el paracetamol en ausencia del alcohol por lo que habrá un riesgo mayor de lesión hepática.

El tiempo transcurrido y la cantidad de alcohol consumido diariamente afectan la cantidad de CYP2E1 expresada en los hepatocitos. La cantidad de paracetamol consumido es un factor determinante principal ya que las dosis recomendadas normalmente no generan habitualmente suficiente NAPQI para que se produzca la lesión hepática. Dosis superiores del medicamento incrementan el riesgo de daño celular en el hígado ya que habrá más fármaco metabolizado por la ruta del CYP2E1. Tanto la vías de sulfatación como de glucuronidación son esenciales para determinar qué cantidad de paracetamol se metabolizará mediante el CYP2E1. Un factor adicional es la presencia de glutatión que se conjuga con el NAPQI y protege al hígado de este metabolito reactivo.

L.J. Brunner, M.E. McGuinness, M.M. Meyer y M-Y- Munar. Acute acetaminophen toxicity during chronic alcohol use. *U.S. Pharmacist* Sept :HS11-HS19, 1999. A este artículo se puede acceder a través de la página web http://www.uspharmacist.com/; y K.E. Thummel, J.T. Slattery, H. Ro, J.Y. Chien, S.D. Nelson, K.E. Lown y P.B. Watkins Ethanol and production of the hepatotoxic metabolite of acetaminophen in healthy adults. *Clin. Pharmacol. Ther*. 67:591, 2000, y J.T. Slattery, S.D. Nelson y K.E. Thummel. The complex interaction between ethanol and acetaminophen. *Clin. Pharmacol. Ter.* 60:241, 1996.

inhibición de la formación del aducto de DNA y en la reducción de su actividad carcinogénica. El papel de los diversos sistemas enzimáticos de destoxificación, entre los que se incluyen reacciones de conjugación tales como la glucuronidación y la sulfatación, la situación del sistema inmune, el estado nutricional, la predisposición genética y la exposición a diversos compuestos químicos ambientales, puede jugar una parte clave en la determinación del papel de las formas de P450 en la lesión celular y en la toxicidad. Uno puede preguntarse: ¿Por qué el sistema de mamíferos posee un enzima que puede producir compuestos altamente tóxicos? La finalidad del sistema citocromo P450 es añadir o exponer grupos funcionales que hacen que la molécula sea más polar y/o susceptible de ser metabolizada por otros sistemas enzimáticos de destoxificación, por lo que la creación de metabolitos tóxicos es una consecuencia inesperada de este proceso. La necesidad de eliminar xenobióticos es más importante que dejar acumular estos compuestos químicos en las células.

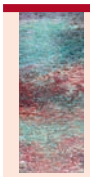
11.6 | INHIBIDORES DE LOS CITOCROMOS P450

Debido a las muchas formas conocidas de citocromo P450, es interesante examinar el papel metabólico de los diferentes enzimas en los órganos en que funcionan. La inhibición del citocromo P450 se ha convertido en un tema de importancia clínica dado que existe un interés en el diseño de inhibidores específicos que impidan el metabolismo de compuestos tanto endógenos como exógenos. También existe un interés significativo en la inhibición del P450 ya que la alteración de la velocidad prevista con que se metaboliza un fármaco puede producir su acumulación y la aparición de efectos adversos.

Un ejemplo de efecto beneficioso de inhibición selectiva del citocromo P450 es la utilización de inhibidores antifúngicos azólicos (**ketoconazol, itraconazol** y **fluconazol**) para controlar infecciones por levaduras. Las **infecciones por levaduras** aparecen en pacientes de SIDA, en pacientes de cáncer sometidos a tratamientos quimioterapéuticos y en pacientes tratados con fármacos inmunosupresores. El CYP51 cataliza la desmetilación de moléculas esteroles, y en las levaduras esta reacción está implicada en la síntesis del ergosterol, que es un importante lípido de

membrana. Una forma de P450, también identificada como CYP51, está presente en los seres humanos y cataliza la desmetilación del lanosterol, reacción que es esencial en la síntesis del colesterol para la formación de hormonas esteroides. Aunque las proteínas CYP51 humana y de levaduras son similares, existen diferencias suficientes entre estas dos formas de P450 para permitir que los agentes azólicos antifúngicos sean inhibidores efectivos de la formación de ergosterol.

Debido a la amplia especificidad de sustrato de las formas de P450, algunas sustancias que son sustratos del P450 también pueden servir como inhibidores competitivos o no competitivos de estas proteínas. Esta inhibición de las formas de P450 por diversos medicamentos es importante debido a que una reducción en la actividad metabólica de las proteínas P450 puede crear problemas *in vivo* en individuos que toman una combinación de fármacos. La observación de que un fármaco puede inhibir un enzima citocromo P450 *in vitro* utilizando formas recombinantes ha ayudado a identificar interacciones potenciales entre medicamentos. En el caso de ciertos fármacos cuya eliminación del cuerpo depende de su metabolismo, la inhibición *in vivo* producirá una acumulación del fármaco antecesor que puede conducir al desarrollo de efectos adversos. En algunasocasiones, la gravedad de los efectos adversos ha provocado la retirada del medicamento para uso en humanos (véase Apli. Clín. 11.4). Aunque un fármaco inhiba una reacción mediada por un citocromo P450 *in vitro*, se debe tener en cuenta que no significa necesariamente que ese efecto inhibidor se observe *in vivo,* ya que la concentración de medicamento necesaria para inhibir un P450 *in vitro* puede que no se alcance nunca *in vivo*.



APLICACIÓN CLÍNICA 11.4

Consecuencias de la inhibición de P450: Interacciones entre fármacos y efectos adversos

El papel que desempeña el citocromo P450 en el metabolismo de los medicamentos y las graves consecuencias de las interacciones medicamentosas se vieron claramente con dos fármacos, la terfenadina (Seldane) y la cisaprida (Propulsid), cuando se inhibió su metabolismo con otros fármacos. Un pequeño porcentaje de sus consumidores experimentaron efectos adversos severos que forzaron a los fabricantes y a la Food and Drug Administration (FDA) a publicar advertencias de que los fármacos no debían tomarse junto con otros que inhiben el CYP3A4. La gravedad de estos efectos adversos forzaron a la FDA a retirar estos medicamentos del mercado.

La FDA aprobó la terfenedina en 1985 para tratar alergias estacionales. La terfenedina se metaboliza rápidamente en el hígado por el CYP3A4 a fexofenadina lo que resulta en bajos niveles del fármaco de origen poco después de su ingestión. Este rápido metabolismo no reduce los efectos terapéuticos de la terfenedina puesto que los efectos están asociados con la fexofenadina. Debido a que una serie de fármacos son también sustratos del CYP3A4 o actúan como inhibidores, el metabolismo de la terfenedina es potencialmente inhibible. En individuos que tomaron terfenedina junto con el antibiótico de tipo macrólido eritromicina o con el agente antifúngico ketoconazol se encontró que tenían unos niveles plasmáticos de terfenadina elevados de manera significativa ya que estos fármacos se unen a CYP3A4 y son potentes inhibidores de esta forma de P450. Un pequeño porcentaje de individuos que utilizaron terfenadina tuvieron problemas cardíacos graves como resultado de este aumento en los niveles plasmáticos de terfenadina, ya que el fármaco producía alteración en los canales de potasio cardíacos e incrementaba el riesgo de una taquicardia ventricular rara, llamada torsades de pointes. Hubo casos de individuos que murieron debido a problemas cardíacos que aparecieron después de tomar terfenedina junto con eritromicina o ketoconazol. La FDA publicó advertencias de que no debía coadministrarse la terfenadina con eritromicina o ketoconazol, o a individuos con una función hepática disminuida que no les permitiera metabolizar los fármacos de forma normal. No obstante, debido a las continuas notificaciones de interacciones medicamentosas graves con la terfenadina, la FDA reevaluó este fármaco y en 1998 propuso retirar su aprobación, una acción inusual. El hecho de que las propiedades terapéuticas de la terfenadina estaban asociadas con su metabolito condujo al laboratorio fabricante a probar la fexofenadina como nueva medicación y sometió este metabolito a aprobación por parte de la FDA. Actualmente se comercializa con el nombre de Allegra.

El cisapride fue aprobado el 1993 para pacientes que sufren de ardor nocturno como resultado de la enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD). La eliminación de este medicamento del cuerpo depende de su metabolismo por el CYP3A4. Cuando se administra solo o con otros fármacos que no inhiben el CYP3A4, el fármaco original no se acumula en el plasma. Sin embargo, cuando el cisapride se toma con ciertos medicamentos que son sustratos o inhibidores del CYP3A4, su metabolismo se reduce y se produce una acumulación del compuesto original con las posteriores administraciones del fármaco. En algunos individuos el aumento en los niveles de cisapride produce arritmias cardíacas. A finales de 1999 se habían descrito anomalías del ritmo cardíaco en 341 pacientes que tomaban cisapride con el resultado de 80 muertes. En consecuencia, la FDA envió alertas estrictas a los médicos y farmacéuticos sobre el uso del cisapride conjuntamente con fármacos que eran sustratos o inhibidores del CYP3A4. El resultado fue que el fabricante del cisapride decidió suspender la comercialización de este medicamento en los Estados Unidos en el año 2000.

Terfedine: proposal to withdraw approval of two new drug applications and one abbreviated new drug application. *Fed. Reg.* 62:1889, 1997. (Se puede acceder a este documento en el sitio internet del *Federal Register* en http://www.access.gpo.gov/su_docs/aces/aces140.html); y Z. Desta, N. Soukhova, S.K. Mahal y D.A. Flockhart. Interaction of cisapride with the human cytochrome P450 system: metabolism and inhibition studies. *Drug Metab. Dispos.* 28:789, 2000.

Los **inhibidores basados en el mecanismo**, los llamados **sustratos suicidas**, presentan una gran similitud con el sustrato de un enzima, pero durante el ciclo catalítico forman con el grupo prostético enzimático o proteína un producto de inhibición irreversible. Tales inhibidores podrían ser altamente específicos para una forma dada de citocromo P450. Esto representa una posible estrategia en el diseño de fármacos. Existe interés en el diseño de inhibidores basados en el mecanismo para CYP19, el citocromo P450 que cataliza la formación de estradiol a partir de androstenodiona. Como ciertos tumores dependen de estrógenos para su crecimiento, (los **tumores mamarios**, por ejemplo), impedir la síntesis de estrógenos sin inhibir la producción de otras hormonas esteroides puede servir como herramienta quimioterápica selectiva para reducir y eliminar tumores.

11.7 | REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CITOCROMO P450

En la actualidad ya se han caracterizado más de 1000 genes de citocromos P450 que codifican diferentes proteínas y catalizan la oxigenación de una gran variedad de sustratos exógenos y endógenos en mamíferos, insectos, bacterias, hongos y plantas. Quedan otros miembros de esta superfamilia génica cuyas secuencias aún no se han determinado. Se considera que dentro de una sola especie pueden estar presentes unos 20-60 citocromos P450 diferentes en los distintos órganos y tejidos. Algunas proteínas P450 pueden encontrarse sólo en determinados momentos de la vida, como por ejemplo el desarrollo fetal. Otras pueden estar presentes en pequeñas cantidades pero que aumentan cuando el animal está expuesto a compuestos químicos denominados inductores.

Muchas formas de citocromo P450 surgieron por fenómenos de duplicación génica y mutaciones ocurridos en los últimos 5–50 millones de años. Las diferentes formas de citocromo P450 entre las diversas especies procarióticas y eucarióticas aparecieron probablemente por la presión selectiva que ejercían las condiciones del medio ambiente, tales como los hábitos alimentarios o la exposición a agentes ambientales. Un examen del árbol filogenético, generado por comparación de las secuencias de aminoácidos, supuesta una velocidad constante de cambio evolutivo, lleva a la conclusión de que los primeros citocromos P450 evolucionaron para metabolizar el colesterol y los ácidos grasos. Por lo tanto, los primeros citocromos podrían haber jugado un papel en el mantenimiento de la integridad de la membrana en los eucariotas primitivos.

Inducción del citocromo P450

La inducción de diversos citocromos P450, tanto por compuestos endógenos como exógenos, se conoce desde mediados de la década de 1960. La **inducción** es el incremento de la cantidad de enzima en respuesta a un agente químico denominado inductor. Se ha demostrado que los mecanismos de inducción de los citocromos P450 se dan tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (p. ej., estabilización del mRNA o una disminución en la degradación de proteína). No es posible predecir el modo de inducción basándose en el compuesto inductor. Un ejemplo de la complejidad del proceso de inducción es el de la CYP2E1 de rata. La cantidad de este citocormo P450 en el hígado aumenta como resultado del tratamiento con moléculas orgánicas pequeñas, tales como el etanol, acetona o pirazol, o durante condiciones de ayuno o diabetes. La administración de estos compuestos orgánicos pequeños aumenta la cantidad de la proteína CYP2E1 sin que aumenten las cantidades de mRNA. Si bien no se entiende completamente el mecanismo, el pirazol podría estabilizar este P450 específico frente a la degradación proteolítica. Sin embargo, en ratas diabéticas, la inducción de la proteína CYP2E1 en un factor de seis se acompaña de un incremento de diez veces en la cantidad de mRNA sin que se produzca incremento en la transcripción del gen, lo que sugiere la estabilización del mRNA.

Se ha indicado el papel de proteínas receptoras específicas del citoplasma en el caso de alguno de los agentes inductores conocidos. Una de las más extensamente estudiadas es la interacción de la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) con su receptor citosólico, también denominado **receptor arilhidrocarburo** (o Ah), que

produce la inducción de las formas CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos funcionan como ligandos del receptor Ah, formando un complejo ligando–receptor que es traslocado al núcleo y se une a regiones reguladoras del lado 5′ de genes de citocromos P450. Se ha visto que una segunda proteína, denominada **traslocador nuclear del receptor Ah** o **proteína Arnt**, interacciona con el receptor Ah unido al ligando. La proteína Arnt actúa como receptor asociado heterodimérico que es esencial ya que permite que este complejo ligando–receptor Ah reconozca su elemento de respuesta del DNA específico. La Figura 11.14 ilustra la interacción del ligando con su receptor y la fijación del receptor asociado heterodimérico. Utilizando la tecnología de transfección de genes de citocromos P450 y vectores de expresión, ha sido posible expresar aquellas porciones del DNA genómico del citocromo P450 que representan la región promotora de la RNA polimerasa II y las secuencias de DNA del lado 5′ en conjunción con otro gen que codifica un enzima que no se expresa en eucariotas. En un ensayo de actividad del enzima procariótico, por ejemplo, cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) en el sistema de expresión, es posible determinar qué secuencias de nucleótidos específicas del DNA intervienen en la regulación de estos genes.

Otro sistema receptor de genes P450 es el **receptor pregnano X (PXR)** que regula los genes *CYP3A*. El término pregnano hace referencia a esteroides de 21 carbonos tales como el metabolito de la progesterona, la 5α-pregnano-3,20-diona. Este compuesto fue identificado como un ligando de PXR y es un potente inductor del gen *CYP3A4* humano. Además de los esteroides C_{21}, otros compuestos con estructura diferente, tales como la **carbamazepina** (fármaco utilizado para el tratamiento de convulsiones) y la **rifampina** (un medicamento antituberculoso), así como la **St. John's wort** (un remedio vegetal utilizado para tratar trastornos del estado de ánimo) son ligandos de PXR. Igual que el receptor Ah, el PXR requiere también un receptor asociado para reconocer elementos de respuesta específicos en la región flanqueante en 5' de los genes *CYP3A*. Esta proteína es el **receptor X de retinoides (RXR)**, la cual forma un complejo heterodimérico (PXR-RXR) que inicia la transcripción de *CYP3A* y otros genes después que este complejo reconoce su elemento de respuesta. La inducción del gen *CYP3A4* es importante porque aproximadamente el 50% de los medicamentos usuales son metabolizados por esta forma de citocromo P450.

Otro inductor de genes de citocromos P450 es el **fenobarbital**, el cual aumenta la tasa de transcripción de varias formas de citocromo P450. Se encontró que una

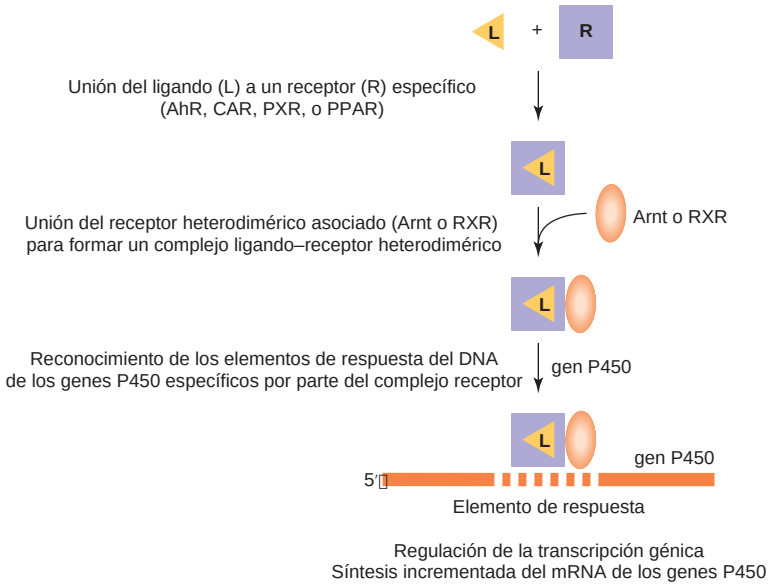


FIGURA 11.14
Diagrama de flujo que demuestra la interacción de un ligando con su receptor y receptor asociado para formar el complejo receptor heterodimérico para iniciar la inducción de formas citocromo P450.

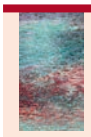
proteína denominada **receptor constitutivo de androstano (CAR)** intervenía en la inducción de los genes *CYP2B* por el fenobarbital. CAR también forma un complejo heterodimérico con **RXR** e interacciona con un elemento de respuesta específico en la región 5′ flanqueante de los genes *CYP2B*. Se encontró que dos esteroides tipo androstano endógenos, el androstanol y el androstenol, son ligandos de CAR y que cuando uno de estos ligandos está unido a CAR, impide la interacción del complejo CAR-receptor RXR con la proteína **SRC-1**. SRC-1 es un coactivador de los receptores nucleares y es necesaria para la activación de la transcripción. La administración de fenobarbital u otros inductores tipo fenobarbital desplazan los ligandos androstano permitiendo la unión de SRC-1 y la transcripción del gen *CYP2B*.

Otro receptor nuclear es el **receptor activado *α* de la proliferación de peroxisomas (peroxisome proliferator activated receptor *α*, PPAR*α*)**, que forma un complejo heterodimérico con RXR que permite el reconocimiento de los elementos de respuesta de los genes *CYP4A* en rata, ratón y conejo. No se ha informado que la proteína CYP4A11 de hígado humano sea inducible. Se ha descrito una gran cantidad de compuestos exógenos y endógenos que sirven como ligandos de PPAR*α* entre los que se incluyen ácidos grasos, leucotrienos, fármacos hipolipidémicos y plastificantes de ftalato.

Debido a que las formas de citocromo P450 metabolizan varios agentes terapéuticos, su inducción aumenta la velocidad a la que se metabolizan los medicamentos, por lo que pueden tener efectos profundos sobre el resultado terapéutico. Ciertas medicaciones se pueden volver inefectivas y otras pueden no ser activadas. En la Apli. Clín. 11.5 se presentan las consecuencias clínicas relacionadas con la inducción de enzimas metabolizadores de medicamentos.

Polimorfismos genéticos del citocromo P450

Además de la exposición a distintos agentes inductores que pueden cambiar el patrón de expresión del citocromo P450 en el hígado y en otros órganos, diferentes personas pueden tener diferentes tasas de metabolismo para un fármaco en particular debido a genes únicos o alelos de los citocromos P450 que poseen. Estos polimorfismos genéticos dan lugar a la expresión de una proteína citocromo P450 que es incapaz de metabolizar un medicamento a una velocidad suficientemente elevada, con lo que se presentan niveles significativamente elevados del fármaco. Los **polimorfismos genéticos** se caracterizan por presentarse en más de un 1% de una población. Puede haber una mayor expresión de variantes alélicas específicas en po-



APLICACIÓN CLÍNICA 11.5
Consecuencias de la inducción de enzimas P450

La inducción de formas de P450 específicas puede disminuir los efectos terapéuticos de fármacos, ya que el aumento en los niveles de P450 en el hígado aumenta la velocidad del metabolismo con una más rápida inactivación/excreción. La inducción del sistema P450 puede también producir efectos adversos debido al incremento en la formación de metabolitos tóxicos.

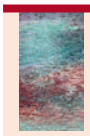
Una interacción intermedicamentosa debida a la inducción de P450 es el incremento de la eliminación de los anticonceptivos orales que puede tener lugar cuando una mujer es tratada con rifampicina, agente antituberculoso que es un potente inductor del CYP3A4. La inducción del CYP3A4 hepático aumenta el metabolismo del etinilestradiol, que es un activo agente contraceptivo oral. El recambio acelerado da lugar a niveles menores del fármaco contraceptivo e incrementa el riesgo de embarazo. El tratamiento con los fármacos anticonvulsivos fenitoína y carbamacepina también puede inducir CYP3A4 y reducir la potencia contraceptiva del etinilestradiol. Es imperativo que una mujer que tome etinilestradiol como contraceptivo simultáneamente con un inductor del CYP3A4 incremente la dosis del contraceptivo o utilice un método o fármaco contraceptivo alternativos.

El ampliamente utilizado remedio natural St. John's wort, que se puede comprar sin receta, induce la actividad CYP3A4. Esto ha motivado la preocupación de que los individuos que toman St. John's wort pueden no beneficiarse de los efectos terapéuticos de medicamentos que son sustrato del CYP3A4. Se pueden producir descensos en los niveles plasmáticos de contraceptivos orales, antiproteasas del VIH, del fármaco inmunosupresor ciclosporina o ciertas estatinas utilizadas para disminuir los niveles de colesterol debido a que todos estos fármacos son sustrato del CYP3A4. Hay individuos que toman el St. John's wort sin conocer sus efectos sobre la eficacia de otros medicamentos que toman simultáneamente.

C.A. Roby, G.D. Anderson, E. Kantor, D.A. Dryer y A.H. Burstein. St. John's wort: effect on CYP3A4 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67:451, 2000; y R.I. Shader y J.R. Oesterheld. Contraceptive effectiveness: cytochromes and induction. *J. Clin. Psychopharmacol.* 20:119, 2000.

blaciones étnicas; por consiguiente, grupos étnicos específicos pueden experimentar más frecuentemente efectos adversos con ciertos medicamentos. Los alelos variantes pueden codificar proteínas que contienen un sitio de fijación de sustrato alterado o un sitio de unión alterado para la NADPH-citocromo P450 reductasa, con reducción de la transferencia electrónica. En algunos casos el alelo variante está producido por una única sustitución nucleotídica o una mutación de desplazamiento de lectura o sin sentido, mientras que en otros casos, la mutación conduce a un codón de terminación temprano que codifica una proteína truncada o más corta que es inactiva. Tales **variantes alélicas** dan lugar a individuos que son **malos metabolizadores**. Estos individuos pueden estar expuestos a riesgo cuando la toxicidad del fármaco depende de la dosis, si la forma no metabolizada de éste es farmacológicamente activa y el medicamento se acumula en el cuerpo al repetir las dosis (véase la Apli. Clín. 11.6). Se calcula que el 40% de las diferentes formas de citocromo P450 humanas que metabolizan xenobióticos son polimórficas. En el caso de CYP2D6 se han identificado 65 alelos humanos diferentes. Debe tenerse en cuenta que la existencia de variantes alélicas de un gen de citocromo P450 no significa que la proteína expresada no vaya a ser funcional o que presentará un recambio metabólico menor. En algunos casos la sustitución de aminoácidos no afecta ni al sitio de fijación de sustrato o a la unión de la NADPH-citocromo P450 reductasa al citocromo P450 específico.

También se han descrito polimorfismos en los que se expresa más de un gen activo debido a duplicación génica de un gen de citocromo P450. De esta manera se transcriben dos o más copias de un gen, lo que conduce a producir cantidades superiores de la proteína activa y a una velocidad de metabolismo acelerada de los sustratos propios de esta forma. Estos individuos son **metabolizadores rápidos** o extensivos.



APLICACIÓN CLÍNICA 11.6
Polimorfismos genéticos de enzimas P450

Se ha demostrado la presencia de alelos múltiples para aproximadamente el 40% de los genes P450 humanos. Estos polimorfismos genéticos pueden producir proteínas P450 defectuosas. En la Apli. Clín 11.1 se describió el polimorfismo de CYP21 y su importancia en el metabolismo de un compuesto endógeno. La ausencia de una forma de P450 o la expresión de proteína no funcional puede crear muchos problemas a un individuo debido a la acumulación de fármacos que no se pueden metabolizar. El descubrimiento de un individuo que sufría una hipotensión exagerada cuando se le administraba un fármaco hipotensor, la debrisoquina, llevó a la caracterización de los individuos que no metabolizaban eficientemente los sustratos catalizados por el CYP2D6. Aproximadamente del 5 al 10% de la población caucásica, un 8% de la africana y afroamericana y un 1% de la asiática es defectiva para la forma catalíticamente activa del CYP2D6. Además de la debrisoquina, otros fármacos metabolizados por el CYP2D6 son la esparteína, la amitriptilina, el dextrometorfano y la codeína. En el caso de la codeína, el CYP2D6 cataliza la *O*-desmetilación de la codeína a morfina. Aproximadamente el 10% de la dosis de codeína es metabolizada a morfina en individuos con un CYP2D6 normal. Los individuos que no poseen la forma normal del gen del CYP2D6 son incapaces de catalizar esta reacción, y no pueden alcanzar los efectos analgésicos asociados con la codeína.

Otro polimorfismo genético se encontró en individuos que no metabolizaban suficientemente la mefenitoína. Este fármaco se utiliza en el tratamiento de la epilepsia. Los individuos que no lo metabolizan correctamente sufren efectos sedantes mayores a dosis normales. El CYP2C19 lleva a cabo la 4-hidroxilación del S-enantiómero de la mefenitoína. Se ha descrito que aproximadamente el 14–22% de la población asiática, del 4 al 7% de la africana y afro-americana y 3% de la población caucásica carecen de la forma activa del gen *CYP2C19*.

Se han encontrado polimorfismos asociados con CYP2C9 en menos del 0,003% de las poblaciones africanas y afroamericanas, del 0,08% de las asiáticas y del 0,36% de las caucásicas. La ausencia de un CYP2C9 funcional puede tener consecuencias graves en un individuo al que se le ha recetado S-warfarina, un medicamento oral administrado para inhibir la coagulación sanguínea. Este medicamento se utiliza durante largos períodos en pacientes que han sufrido un ataque al corazón o una embolia para prevenir la reaparición de coágulos que pueden precipitar otro episodio amenazador para la vida. Es muy importante que los niveles plasmáticos del fármaco se mantengan dentro de unos márgenes específicos ya que cantidades excesivas del medicamento podrían producir hemorragias incontroladas y, posiblemente, la muerte. La warfarina depende del CYP2C9 para su metabolismo y eliminación. La sustitución de una isoleucina en lugar de una leucina en el residuo 359 de este P450 produce una pérdida sustancial de actividad enzimática. Esta variante alélica se denomina CYP2C9*3. Si se receta una dosis de 5 mg diarios de warfarina a un paciente que carece de un CYP2C9 funcional, se produciría una hemorragia incontrolable a partir de un simple corte. Los individuos deficientes en CYP2C9 pueden requerir solamente 0,5-1 mg de warfarina semanal en lugar de los 4-5 mg diarios prescritos a un paciente que posee la forma normalmente activa de este enzima P450.

Ingelman-Sundberg., M., Oscarson, M. y McLellan, R. A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol. Sci* 20:342, 1999.

11.8 | OTRAS OXIGENACIONES MEDIADAS POR HEMOPROTEÍNAS Y FLAVOPROTEÍNAS: CITOCROMOS P450 SOLUBLES Y ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS

Anteriormente se ha descrito el CYP51 de levadura en relación con su sensibilidad a los agentes antifúngicos azólicos para reducir las infecciones por levaduras. Se ha comprobado que las proteínas **citocromo P450 bacterianas**, debido a sus estructuras singulares, constituyen una importante herramienta de investigación para proporcionar información estructural básica sobre diferentes citocromos P450, incluidas las formas de mamífero.

Se han realizado estudios muy amplios sobre un citocromo P450 de *Bacillus megaterium*, el CYP102, y su estructura singular ha permitido uno de los primeros exámenes detallados a nivel atómico de los dominios de fijación de sustrato y de hemo de las proteínas citocromo P450. El citocromo P450 en *Bacillus megaterium* es similar a los enzimas microsómicos de mamífero en cuanto que se requieren grupos prostéticos FAD, FMN y hemo para la actividad citocromo P450. Sin embargo, su estructura es única porque estos grupos prostéticos están incorporados en una única cadena polipeptídica en la que la reductasa y los péptidos que contienen hemo están fundidos en una sola proteína de gran tamaño. Nuestro conocimiento básico de las propiedades estructurales de un citocromo P450 concreto, tales como el patrón de plegamiento de la proteína y la composición de hojas β y hélices α, se desarrolló a partir de citocromos P450 bacterianos, ya que son solubles y cristalizan más fácilmente. A diferencia de las proteínas citocromo P450 de mamífero, que son proteínas integrales de membrana y difíciles de cristalizar, CYP102 se puede romper en distintas proteínas con hemo y flavina, que se cristalizaron y estudiaron por cristalografía de rayos X.

Recientemente caracterizó otro citocromo P450 bacteriano, el CYP51 de *Mycobacterium tuberculosis*, y se encontró que era una proteína soluble que no estaba fundida con el dominio FAD/FMN de la NADPH-citocromo P450 reductasa, tal como sucede con CYP102. Este CYP51 soluble ha sido cristalizado y se ha determinado su estructura tridimensional.

Aunque la proteína CYP102 es única entre las formas citocromo P450 bacterianas porque sus dominios reductasa y hemo están fusionados en una única proteína soluble, existe otro grupo de proteínas de mamífero que se parecen a CYP102 en sus propiedades moleculares y bioquímicas. Estas proteínas de mamífero son las **óxido nítrico sintasas** (NOS) que han recibido una atención considerable durante la última década. Las proteínas NOS son las primeras proteínas de mamífero identificadas que contienen grupos prostéticos FAD, FMN y hemo en una sola cadena polipeptídica. Las proteínas NOS funcionan en diversos procesos fisiológicos significativos y la importancia de estos enzimas en la biología de los mamíferos fue reconocida mediante la concesión del Priemio Nobel de 1998 a los Dres. Ferid Murad, Louis J. Ignarro y Robert F. Furchgott por la elucidación de las funciones fisiológicas del óxido nítrico (NO) en la salud y en la enfermedad.

Tres óxido nítrico sintasas realizan diversas funciones fisiológicas

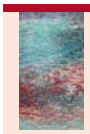
La liberación de óxido nítrico a partir de fármacos terapéuticos se ha usado en el tratamiento de la angina de pecho desde 1867, cuando Sir Thomas Lauder Brunton describió el uso de la nitroglicerina y del nitrato de amilo en sus pacientes. No obstante, no se supo hasta la década de 1980 que el **óxido nítrico**, o NO•, era el agente activo en la dilatación de los vasos sanguíneos. La demostración de que este gas diatómico con radical libre era el principal **vasodilatador** endógeno liberado por el endotelio vascular condujo a la búsqueda de una fuente enzimática de NO•. La fuente de NO• es el grupo guanidino del aminoácido natural L-arginina. La reacción catalizada por los enzimas responsables de la conversión de L-arginina en L-citrulina y NO• se muestra a continuación:

$$\text{L-arginina} + \text{NADPH} \rightarrow \text{L-citrullina} + \text{NO}\bullet + \text{NADP}^+$$

Se han identificado tres genes que codifican las isoformas de NOS. Los respectivos enzimas se han designado neuronal (NOS-I), de macrófago o inducido (NOS-II), o endotelial (NOS-III). Cualquier tejido o célula puede contener más de una isoforma de óxido nítrico sintasa, contribuyendo así a la producción de NO• en diversas condiciones fisiológicas. Los estudios realizados con el tipo de óxido nítrico sintasa de los macrófagos llevaron a la conclusión de que, después de tratar a los animales con **citoquinas** o **lipopolisacáridos**, el aumento en la producción de NO• se debía a esta isoforma, ya que, cuantitativamente, se trata de la principal fuente de NO•. Posteriormente se vio que la L-arginina era la precursora de NO• en células endoteliales y nerviosas. La producción de NO• es necesaria para el mantenimiento del **tono vascular,** la **agregación plaquetaria**, la **transmisión nerviosa** y la **citotoxicidad** bacteriana o tumoral (véase Apli. Clín. 11.7).

Aspectos estructurales de las óxido nítrico sintasas

Aunque la escritura de la reacción no da idea de la estequiometría global, es representativa de una reacción de monooxigenación, y el mecanismo es similar al catalizado por los citocromos P450. Los átomos de oxígeno que se incorporan a la L-citrulina y al NO• provienen del oxígeno atmosférico. Inicialmente se pensó que la oxigenación se daba por mediación de la **tetrahidrobiopterina** (H_4B) cofactor ne-



APLICACIÓN CLÍNICA 11.7
Aspectos clínicos de la producción de óxido nítrico

Si bien el NO• en macrófagos es esencial para sus funciones tumoricida y bactericida, un exceso de producción de NO• (a partir de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa, iNOS o NOS-II) se ha relacionado con el shock circulatorio séptico o inducido por citoquinas, a través de la actividad de la guanilato ciclasa. Este mecanismo es la causa de una hipotensión profunda en pacientes postoperatorios cuya recuperación se ve complicada con una infección bacteriana que produce endotoxinas. La hipotensión en estos pacientes es a menudo refractaria al tratamiento con fármacos vasoconstrictores convencionales. Se están estudiando intervenciones terapéuticas con inhibidores NOS en enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, tales como pancreatitis y colitis ulcerosa, y en la artritis.

La isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa, eNOS o NOS-III parece que juega un papel crucial en el mantenimiento de un tono vascular básico en la regulación hemodinámica, de modo que un desequilibrio en la producción de NO• puede dar lugar a hipertensión, trombosis o ateroesclerosis. Por otra parte, la aplicación directa de NO• gaseoso puede ser también beneficiosa en el tratamiento de la hipertensión pulmonar. Su utilidad clínica se determinó tras estudios sobre la administración de NO• inhalado en el laboratorio y a pacientes adultos con hipertensión pulmonar. En poblaciones seleccionadas de pacientes, por ejemplo niños y adultos hipóxicos, se ha demostrado que el NO• inhalado mejora la oxigenación arterial y reduce la hipertensión arterial pulmonar. Se ha utilizado en pacientes recién nacidos con insuficiencia respiratoria hipóxica para reducir la necesidad de oxigenación de membrana extracorpórea, que es cara e invasiva. El NO• inhalado también se ha utilizado para tratar el síndrome del dolor respiratorio agudo (ARDS); el resultado es la vasodilatación pulmonar inducida por el NO•, la disminución de la presión arterial pulmonar (MPAP) y un aumento del índice cardíaco.

Recientemente, se han realizado experimentos con ratones en los que se había delecionado el gen de la nNOS, o NOS-I, dando como resultado animales con estómagos distendidos debido a la constricción del esfínter pilórico. nNOS se localiza en las neuronas que inervan el plexo mientérico. Este trabajo ha dado lugar, inesperadamente, a un modelo para la enfermedad clínica denominada estenosis pilórica hipertrófica infantil. Se ha demostrado también que estos ratones defectivos en nNOS eran resistentes a los daños cerebrales causados por lesiones isquémicas que suelen conducir a los infartos vasculares, lo que sugiere que nNOS está implicada en este proceso patológico. Aunque la conexión directa con la enfermedad humana no se ha llevado a cabo todavía, en este ejemplo, se presenta un paradigma que puede ser examinado en ámbitos clínicos y patológicos. Tal paradigma ha de incluir la continuidad de efectos desde acontecimientos fisiológicos a patológicos que producen NO• como molécula señal. A medida que aumenta la concentración de NO• se da un gradiente de consecuencias que van desde la activación de la guanilato ciclasa, la acción como antioxidante, la inactivación de enzimas, la inducción de proteínas de estrés, la apoptosis y, finalmente, la lesión del DNA. La existencia de este gradiente sugiere que la inhibición específica de las isoformas de la óxido nítrico sintasa es un objetivo ideal para la intervención terapéutica en diversas circunstancias. El desarrollo de inhibidores específicos potentes de las isoformas de óxido nítrico sintasa constituye un área de investigación activa que se está llevando a cabo en colaboración por investigadores académicos y la industria farmacéutica.

W. E. Hurford, W. Steudel y W. Zapol. Clinical therapy with inhaled nitric oxide in respiratory diseases. E Louis J. Ignarro (Ed.), *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. San Diego, CA: Academic Press, 2000, Cap. 56, p. 931: y Y.-M. Kim, E. Tzeng y T.M. Billiar. Role of NO and nitrogen intermediates in regulation of cell functions. En M.S. Goligorsky y S.S. Gross (Eds.), *Nitric Oxide and the Kidney.Physiology and Pathophysiology*. New York: Chapman and Hall, 1997, Cap 2, p. 22.

cesario para la reacción global, análoga a la reacción de la fenilalanina hidroxilasa (véase p. 797). El descubrimiento de que el hemo (ferroprotoporfirina IX) es un grupo prostético funcional asociado con las tres isoformas de NOS, ha hecho que en los estudios posteriores se incluyan las interacciones entre los dominios flavoproteína y hemoproteína de estos enzimas. Estas complejas proteínas han de entenderse ahora desde el punto de vista del papel de las flavinas, el hemo y la H_4B, situados bajo el control de la Ca^{2+}/calmodulina en el caso de las isoformas neuronal (NOS-I) y endotelial (NOS-III). En la Figura 11.15 se presenta la organización estructural global de la isoforma neuronal de la NOS (NOS-I).

Se cree que el flujo de electrones puede darse de forma análoga a la de los sistemas electrónicos en los que intervienen citocromos P450. El donador de electrones es el NADPH, que cede dos electrones al **FAD**, el cual, a su vez, reduce el **FMN**. El FMN reduce el grupo prostético ferrohemo a su forma ferrosa, a la cual se puede unir ahora el oxígeno para oxigenar el sustrato, la L-arginina. La reacción global se inhibe por monóxido de carbono y la actividad enzimática es completamente dependiente de la unión de calmodulina, la cual requiere elevadas concentraciones de Ca^{2+} para las isoformas neuronal y endotelial. La **calmodulina** (véase p. 525) interviene en el control del flujo electrónico entre los grupos prostéticos de la flavina, y entre la flavina de salida, FMN, y el grupo prostético hemo del módulo oxigenasa.

Al igual que en la situación observada con los sistemas de hidroxilación en los que interviene el citocromo P450, puede haber una pérdida de electrones hacia el O_2 molecular para formar el **anión superóxido**, reducido con un electrón, en condiciones en las que no se da el flujo de electrones hacia el hemo ("desacoplado"). Esto puede tener lugar en ausencia de H_4B, por ejemplo, en el caso de la óxido nítrico sintasa endotelial. La adición de Ca^{2+}/calmodulina a las isoformas de la óxido nítrico sintasa en ausencia de L-arginina y/o H_4B aumenta el flujo electrónico, el cual se disipa en forma de producción de anión superóxido. Se ha implicado la formación de una especie de oxígeno reducida, tal como el anión superóxido, en la **lesión isquemia/reperfusión** en circunstancias en las que primeramente se ha eliminado el oxígeno de los tejidos y a continuación se reperfunden con sangre rica en oxígeno. Este tipo de lesión tiene lugar en la **trombosis cerebral** y en los tejidos que han sido separados para **transplante**.

Es notable la analogía entre los sistemas que sintetizan óxido nítrico y los sistemas mediados por citocromo P450, pero las diferencias son significativas, y el módulo oxigenasa representa probablemente un ejemplo de evolución convergente con los citocromos P450. Aún no se han determinado las estructuras tridimensionales de citocromos P450 o de óxido nítrico sintasas de mamíferos representativos.

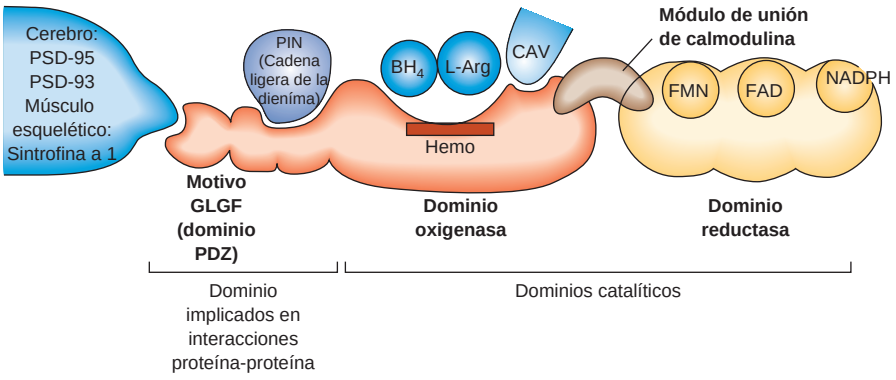


FIGURA 11.15
Estructura modular de la óxido nítrico sintasa neuronal, donde se indican las localizaciones aproximadas de los grupos prostéticos y los cofactores.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias generales sobre el metabolismo de fármacos y citocromo P450

Cupp, M. y Tracy, T.S. Cytochrome P450: new nomeclature and clinical implications. *Am. Fam. Physician* 57:107, 1998

Estabrook, R. W., Cooper, D. Y. y Rosenthal, O. The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. Zeit*. 338:741, 1963

Gibson, G. G. y Skett, P. *Introduction to Drug Metabolism*, 2nd ed. London: Academic, 1994.

Lewis, D. F. V. *Cytochromes P450. Structure, Function and Mechanism*. Bristol, PA: Taylor and Francis, 1996.

Nelson, D. R. Cytochrome P450 and individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* 369:1, 1999.

Ortiz de Montellano, P. R. *Cytochrome P450. Structure, Mechanism and Biochemistry*. New York. Plenum Press, 1995.

Parkinson, A. Biotransformation of xenobiotics. En C.D. Klassen (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. New York. McGraw Hill, 1996, Chap. 6, p.113.

Especificidad de sustrato de los citocromos P450: Funciones fisiológicas

Cunningham, F. G., MacDonald, P. C., Gant, N. F, Leveno, K. J., Gilstrap, L. C., Hankins, G.D.V. y Clark, S.L. The placental hormones. En: *Williams Obstetrics*, 20th ed. Stamford, CT: Appleton and Lange, 1997, Chap. 6, p. 125.

Donohoue, P. A., Parker, K. y Migeon, C. J. Congenital adrenal hyperplasia. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th ed., Vol. II. New York: McGraw-Hill, 1995, Chap. 94, p. 2929..

Graham, S.E. y Peterson, J.A. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch. Biochem. Biophys.* 369:24, 1999.

Graham-Lorence, S., Amarneh, B., White, R. E., Peterson, J. A. y Simpson, E. R. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Protein Sci.* 4:1065, 1995.

Masters, B. S. S., Muerhoff, A. S. y Okita, R. T. Enzymology of extrahepatic cytochromes P450. En: F. P. Guengerich (Ed.), *Mammalina Cytochromes P450*. Boca Ratón, FL: CRC Press, 1987, Chap. 3, p. 107.

Inhibición del citocromo P450

Lin, J.H. y Lu, AA.Y.H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol. Rev.*49:403, 1997.

Thummel, K.E. y Wilkinson, G.R. *In vitro* and *in vivo*drug interactions involving human CYP3A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*38:389, 1998.

Regulación de la expresión del citocromo P450

Denison, M. S. y Whitlock, J. P. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* 270:18175, 1995.

Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. y McLellan, R.A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends. Pharmcol. Sci.* 20:342, 1999.

Kalow, W. *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*. New York: Pergamon Press, 1992.

Kalow, W. Pharmacogenetics in biological perspective. *Pharmacol. Rev*. 49:369, 1997.

Meyer, U. A. y Zanger, U.M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:269, 1997.

Waxman, D.J. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, RXR, PPAR, *Arch. Biochem. Biophys.* 369:11, 1999.

Bioquímica y fisiología de la formación del óxido nítrico

Bredt, D. S. y Snyder, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem*. 63:175, 1994.

Garthwaite, J. y Boulton, C. L. Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol*. 57:683, 1995.

Griffith, O. W. y Stuehr, D. J. Nitric oxide synthases—properties and catalytic mecanism. *Annu. Rev. Physiol*. 57:707, 1995.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. y Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9265, 1987.

Khan, M. T. y Furchgott, R .F. Additional evidence that endothelium-derived factor is nitric oxide. En: M. J. Rand y C. Raper (Eds.), *Pharmacology*. Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 341.

Marletta, M. A. Approaches toward selective inhibition of nitric oxide synthase. *J. Med. Chem.* 37:1899, 1944.

Masters, B. S. S. Structural variations to accomodate functional themes of the isoforms of nitric oxide synthases. En: L.J. Ignarro (ed.), *Nitric Oxide, Biology and Pathobiology*. San Diego, CA: Academic Press, 2000, P. 91.

Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. y Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524, 1987.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Todo lo siguiente es cierto acerca de una molécula designada como citocromo P450, EXCEPTO:
   A. contiene un hemo como grupo prostético.
   B. cataliza la hidroxilación de un sustrato hidrofóbico.
   C. puede aceptar electrones de un compuesto como el NADPH.
   D. sufre un cambio en el hierro del grupo hemo tras la unión de un sustrato.
   E. proviene de la misma familia génica que todas las demás moléculas denominadas citocromos P450.

2. Las funciones conocidas para los citocromos P450 incluyen todas las siguientes EXCEPTO:
   A. síntesis de hormonas esteroides.
   B. conversión de algunos compuestos químicos en mutágenos.
   C. hidroxilación de un aminoácido.
   D. inactivación de algunos fármacos hidrofóbicos.
   E. metabolismo de derivados de ácidos grasos.

3. Las flavoproteínas son normalmente intermediarios en la transferencia de electrones desde el NADPH al citocromo P450 debido a que:
   A. el NADPH no puede penetrar la membrana.
   B. las flavoproteínas pueden aceptar dos electrones del NADPH y cederlos de uno en uno al citocromo P450.
   C. tienen un potencial de reducción más negativo que el NADPH, por lo que aceptan electrones más fácilmente.
   D. como proteínas redox, pueden unirse al citocromo P450, mientras que el NADPH, que no es una proteína, no puede hacerlo.
   E. contiene centros ferrosulfurados.

4. La NADPH–citocromo P450 reductasa:
   A. utiliza FAD y FMN como grupos prostéticos.
   B. se encuentra en las mitocondrias.
   C. necesita un centro ferrosulfurado para su actividad.
   D. siempre transfiere sus electrones al citocromo b_5.
   E. puede utilizar NADH del mismo modo que NADPH.

5. La NADPH–adrenodoxina reductasa:
   A. se encuentra en el retículo endoplasmático.
   B. transfiere sus electrones a una proteína con centros ferrosulfurados.
   C. tiene un grupo de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo amino.
   D. reacciona directamente con el citocromo P450.
   E. reacciona directamente con el citocromo b_5.

6 Los sistemas citocromo P450 son capaces de oxidar:
   A. grupos —CH_2—.
   B. anillos bencénicos.
   C. átomos de nitrógeno en un compuesto orgánico.
   D. átomos de azufre en un compuesto orgánico.
   E. todas las anteriores.

7. En la conversión de colesterol a hormonas esteroides en la glándula adrenal:
   A. todas las oxidaciones del citocromo P450 tienen lugar en el retículo endoplasmático.
   B. todas las oxidaciones del citocromo P450 tienen lugar en la mitocondria.
   C. la rotura de la cadena lateral de colesterol a pregnenolona es uno de los sistemas citocromo P450 que utiliza adrenodoxina reductasa.
   D. el citocromo P450 es necesario para la formación de aldosterona y cortisol, pero no para la formación de andrógenos y estrógenos.
   E. la aromatización del primer anillo del esteroide no utiliza citocromo P450, ya que ello implica eliminación de un grupo metilo y no una hidroxilación.

8. El benzo[*a*]pireno, xenobiótico producido por la combustión de diferentes sustancias:
   A. induce la síntesis de citocromo P450.
   B. sufre una epoxidación por un citocromo P450.
   C. en animales, es convertido en un potente carcinógeno por el citocromo P450.
   D. pasaría a ser más soluble en agua tras la acción del citocromo P450.
   E. todas las anteriores.

9. El polimorfismo genético en los genes del citocromo P450:
   A. puede hacer que un individuo metabolice muy poco ciertos fármacos
   B. puede hacer que un individuo metabolice ciertos medicamentos más rápidamente de lo normal.
   C. puede conducir a que un grupo étnico específico experimente más frecuentemente efectos adversos con ciertos medicamentos.
   D. todo lo anterior es correcto.
   E. nada de lo anterior es correcto.

Preguntas 10 y 11: Dado que los remedios de herbolario no son fármacos que necesiten receta médica, existen muchos pacientes que no comunican a su médico que utilizan dichos productos. Un médico indicó a su paciente que sus niveles de colesterol en sangre no respondían al medicamento estatina que estaba tomando, aunque este tipo de fármaco es, normalmente, muy efectivo. Conversaciones posteriores descubrieron que el paciente también tomaba St. John's wort, una hierba muy utilizada para mejorar el estado de ánimo. St. John's wort induce una actividad citocromo P450 (CYP3A4). Las estatinas son unos de los múltiples fármacos que son metabolizados por CYP3A4.

10. La inducción de citocromos P450:
   A. se produce sólo por compuestos exógenos.
   B. se produce sólo a nivel de transcripción.
   C. resulta necesariamente del incremento de la transcripción del mRNA apropiado.
   D. requiere la formación de un complejo proteico inductor–receptor.
   E. puede producirse por procesos postranscripción.

11. Las estatinas podrían ser consideradas xenobióticos (sustancias exógenas metabolizadas por el cuerpo). Muchos xenobióticos son oxidados por los citocromos P450 para:
   A. hacerlos carcinógenos.
   B. aumentar su solubilidad en un ambiente acuoso.
   C. potenciar su deposición en el tejido adiposo.
   D. aumentar su actividad farmacológica.
   E. todas las anteriores.

Preguntas 12 y 13: Algunos pacientes muestran hipotensión profunda después de cirugía abdominal o trauma abdominal complicado por infecciones bacterianas que producen endotoxinas. Tal hipotensión es, a menudo, refractaria al tratamientos con medicamentos vasoconstrictores convencionales. Se cree que esta hipotensión se debe a una sobreproducción de óxido nítrico por la forma inducida de la óxido nítrico sintasa (NOS). La administración de inhibidores de la NOS específicos para esta forma podría constituir un tratamiento adecuado para estos pacientes.

12. El óxido nítrico:
   A. se forma espontáneamente por reducción del NO_2.
   B. se sintetiza sólo en macrófagos.
   C. se sintetiza a partir de la arginina.
   D. actúa como vasoconstrictor potente.
   E. tiene tres isoformas.

13. La óxido nítrico sintasa:
   A. cataliza una reacción dioxigenasa.
   B. es mecanísticamente similar a la fenilalanina hidroxilasa, ya que requiere tetrahidrobiopterina.
   C. acepta electrones del NADH.
   D. utiliza un flujo de electrones desde el NADPH al FAD, al FMN y al hierro del hemo.
   E. la inhibe el Ca^{2+}.

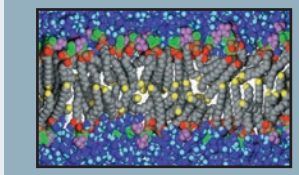
Problemas

14. El fenobarbital es un potente inductor del citocromo P450. La warfarina, un anticoagulante, es un sustrato del citocromo P450 con el resultado que se metaboliza el fármaco y se elimina del cuerpo más rápidamente de lo normal. Si se añade fenobarbital al régimen terapéutico de un paciente, sin cambiar la dosificación de warfarina, ¿cuál cree que sería el efecto? ¿Qué sucedería si se ajustase la dosis de warfarina para obtener una respuesta adecuada y a continuación se eliminase el fenobarbital sin ajustar la dosis de warfarina?

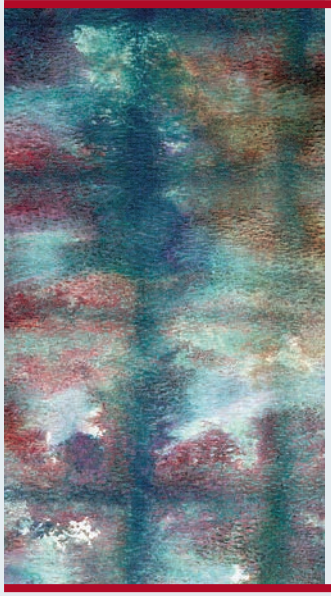
15. El paracetamol se metaboliza principalmente mediante sulfatación y glucuronidación a compuestos que se excretan. También se puede metabolizar por un citocromo P450 (CYP2E1) dando un intermedio altamente reactivo (NAPQI) que puede dañar las células hepáticas. El alcohol es inductor y sustrato de CYP2E1. Si se toma paracetamol varias horas después de beber alcohol, se aumenta mucho la toxicidad hepática del paracetamol. Si el alcohol y el paracetamol se consumen conjuntamente no se obsserva este aumento de toxicidad. ¿Por qué?

RESPUESTAS

1. **E** Se conocen varias familias génicas. El número que sigue a las letras CYP indica la familia. A: Todos los citocromos son proteínas con hemo. B: Los tipos de sustratos son hidrofóbicos. Se clasifica como una monooxigenasa. C: Este es el dador electrónico usual. D: El cambio de hexa a pentacoordinado da al compuesto un potencial reductor más positivo.
2. **C** Los citocromos P450 no son las únicas hidroxilasas; existen otros tipos que son activas con aminoácidos.
3. **B** El grupo hemo sólo puede aceptar un electrón a la vez, mientras que el NADPH siempre dona dos electrones a la vez. A: El NADPH pasa sólo electrones; no ha de penetrar la membrana. C: Si esto fuera cierto, el flujo de electrones no se produciría de la manera en que se produce. D: No se conoce que la unión proteína–proteína juegue un papel aquí. E: Los centros ferrosulfurados juegan un papel en algunos sistemas, pero no en todos. Las flavoproteínas no constituyen el único sistema con centros ferrosulfurados
4. **A** Este enzima es una de las dos proteínas de mamíferos que se sabe que lo hacen. B: Ésta se encuentra en el retículo endoplasmático. C: Algunas reductasas lo hacen, pero no ésta. D: Sólo ciertas reacciones catalizadas por el enzima. E: Existen reductasas dependientes de NADH, pero se trata de enzimas distintos.
5. **B** La proteína ferrosulfurada es la adrenodoxina, que transfiere el electrón al citocromo P450. A y C: Éste es un enzima mitocondrial. D y E: Véase B.
6. **E** Todos estos tipos de reacción son correctos.
7. **C** Este es un proceso mitocondrial. A y B: La síntesis de hormonas implica una serie de reacciones que van y vuelven entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático. D y E: La eliminación de las cadenas laterales empieza frecuentemente con reacciones de oxidación.
8. **E** A: No es raro que los xenobióticos induzcan la síntesis de algo que potenciará su propio metabolismo. B y C: La epoxidación es la primera etapa en la conversión de este compuesto a uno que es carcinógeno, otro caso habitual. D: El benzo[*a*]pireno, con sus cuatro anillos bencénicos fusionados, es altamente hidrofóbico; la introducción de oxígenos aumenta la solubilidad en agua.
9. **D** Esto sucede si las variantes alélicas codifican proteínas inactivas o menos activas. B: Si hay duplicación génica un individuo puede tener cantidades mayores de proteína activa. C: Puede existir una mayor expresión de variantes alélicas específicas en poblaciones étnicas específicas.
10. **E** Puede haber una estabilización del mRNA (tal como se ve en ratas diabéticas) o una disminución en la degradación de la proteína, lo que puede ser un mecanismo para el pirazol. A: Tanto sustancias endógenas como exógenas pueden inducir citocromos P450. B y C: La modificación transcripcional es sólo uno de los mecanismos de inducción (véase E). D: Esto se ha demostrado mediante inducción debida a algunos compuestos, pero con otros, como el fenobarbital, eso no sucede.
11. **B** Los tipos de xenobióticos oxidados por los citocromos P450 son normalmente altamente lipofílicos, pero han de ser excretados en la orina o bilis acuosas. A: Esto puede ocurrir, pero ciertamente no es el propósito. C: Esto lo realizan antes de la oxidación. D: La oxidación tiende a reducir la actividad farmacológica.
12. **C** El otro producto es la citrulina. A: Se forma a partir de la arginina. B: Una de las isoformas de la NO sintasa ha sido encontrada en macrófagos, pero también existen las formas neuronal y endotelial. D: El óxido nítrico es un vasodilatador, lo cual es la base de la utilización de nitroglicerina para la angina de pecho. E: Se han identificado tres isoformas de la óxido nítrico sintasa.
13. **D** Este es el segundo enzima de mamífero que se sabe que utiliza tanto FAD como FMN. A: La reacción es una monooxigenación. B: Se requiere H_4B, pero la acción del enzima es similar a la del sistema mediado por citocromo P450. C: El donador es NADPH. E: El sistema necesita Ca^{2+}– calmodulina, al menos en sus formas neuronal y endotelial.
14. Si la warfarina es metabolizada y eliminada más rápidamente por el citocromo P450, su eficiencia terapéutica se ve disminuida. Por lo tanto, a igual dosis será menos efectiva como anticoagulante y existe un mayor riesgo de formación de coágulos. Si se retira el fenobarbital, los niveles de citocromo P450 descenderán con el tiempo hasta el nivel sin inducción. Sin cambio en el nivel de warfarina, habrá finalmente una mayor posibilidad de hemorragia.
15. Los efectos tóxicos del paracetamol se deben a la producción de NAPQI generado por CYP2E1. En presencia de alcohol aumentan los niveles de CYP2E1 (inducido). Cuando se consumen conjuntamente el alcohol y el paracetamol compiten por el enzima con lo que el metabolismo del paracetamol por esta ruta está disminuido. Si el alcohol se consume solo, induce el enzima. Si se consume más tarde el paracetamol, su metabolismo por esta vía es más rápìdo (no hay competición con el alcohol) y se forma más NAPQI. Obviamente otro factor son los niveles de paracetamol consumido. Pequeñas cantidades pueden ser tratadas por las rutas normales de conjugación de una manera no tóxica.



12



MEMBRANAS BIOLÓGICAS: ESTRUCTURA Y TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS

Thomas M. Devlin

12.1 VISIÓN GENERAL 494

12.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MEMBRANAS 494

Los lípidos son componentes principales de las membranas 495
Los glicerofosfolípidos son los lípidos más abundantes de las membranas 495
Los esfingolípidos se encuentran en las membranas 498
El colesterol es un componente importante de las membranas plasmáticas 500
La composición lipídica varía según las membranas 500
Las proteínas de membrana se clasifican según su facilidad de extracción 502
Los glúcidos de las membranas se presentan en forma de glucoproteínas o glucolípidos 502

12.3 MICELAS Y LIPOSOMAS 502

Los lípidos forman estructuras vesiculares 502
Las membranas de los liposomas son similares a las membranas biológicas 503

12.4 ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS 505

Modelo de mosaico fluido de las membranas biológicas 505
Las proteínas integrales de membrana están sumergidas en la bicapa lipídica 505
Las proteínas periféricas de membrana tienen diversos modos de anclaje 507
Los eritrocitos humanos son ideales para el estudio de la estructura de las membranas 508
Los lípidos se distribuyen de forma asimétrica en las membranas 508
Las proteínas y los lípidos difunden en las membranas 509

12.5 MOVIMIENTO DE LAS MOLÉCULAS A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS 511

Algunas moléculas difunden a través de las membranas 512
Se puede facilitar el movimiento de moléculas a través de las membranas 512
- Canales de membrana 512
- Transportadores 513
- Translocación de grupo 513

Los sistemas de transporte de membrana presentan características comunes 513
En el transporte de moléculas de soluto existen cuatro pasos comunes 514
Energética de los sistemas de transporte de membrana 515

12.6 CANALES Y POROS 516

Los canales y los poros de las membranas funcionan de forma distinta 516
La apertura y el cierre de los canales están sujetos a control 516
Los canales de sodio y de cloruro 516
El canal nicotínico de la acetilcolina (nAChR) 518
Uniones en hendidura y poros nucleares 518

12.7 SISTEMAS DE TRANSPORTE PASIVO FACILITADO 519

El transporte de glucosa está facilitado 520
El Cl^- y el HCO_3^- se transportan mediante un mecanismo de cotransporte antiparalelo (antiport) 520
La mitocondria contiene diversos sistemas de transporte 521

12.8 SISTEMAS DE TRANSPORTE FACILITADO ACTIVO 522

La translocación de Na^+ y K^+ es un sistema primario de transporte activo 522
Todas las membranas plasmáticas contienen una ATPasa activada por Na^+ y K^+ 522
La translocación de Ca^{2+} es otro ejemplo de sistema de transporte activo primario 523
Proteínas transportadoras con caset fijadora de ATP 525
El transporte de glucosa y de aminoácidos dependiente de Na^+ son sistemas de transporte activo secundario 526

La translocación de grupo requiere la modificación química del sustrato transportado 526
Resumen de los sistemas de transporte 527

12.9 IONÓFOROS 529

BIBLIOGRAFÍA 531

PREGUNTAS 531

RESPUESTAS 533

APLICACIONES CLÍNICAS

12.1 Los liposomas como transportadores de fármacos y enzimas 504
12.2 Anormalidades en la fluidez de las membranas celulares en estados patológicos 510
12.3 La fibrosis quística y el canal de Cl^- 517
12.4 Enfermedades debidas a la pérdida de sistemas de transporte de membrana 529

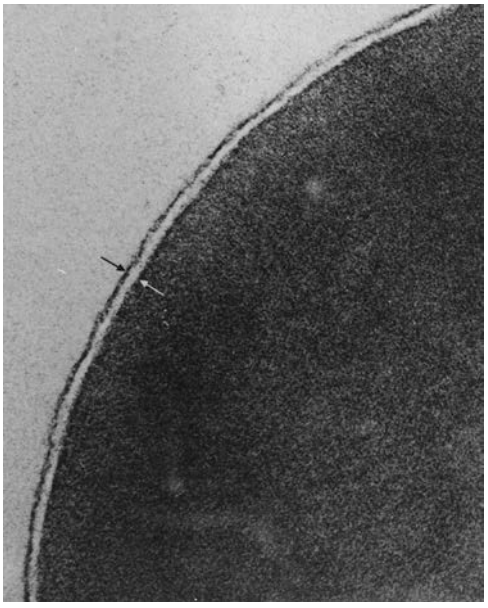


FIGURA 12.1
Micrografía electrónica de la membrana plasmática eritrocitaria que muestra la apariencia trilaminar.
Un espacio claro separa dos líneas electrónicamente densas. La microscopia electrónica ha demostrado que la línea densa interna es frecuentemente más gruesa que la línea exterior. Aumento aproximado: × 150 000.
Cortesía del Dr. J. D. Robertson. Duke University, Durham, North Carolina.

12.1 VISIÓN GENERAL

Las **membranas biológicas**, tanto las de las células eucarióticas como de las procarióticas, poseen los mismos tipos de componentes químicos, una organización estructural similar y una serie de propiedades en común. Presentan, sin embargo, grandes diferencias en el tipo particular de lípidos, proteínas o glúcidos que las componen, pero no en las interacciones fisicoquímicas de estas moléculas. Las membranas tienen un aspecto trilaminar cuando se observan por microscopia electrónica (Figura 12.1); se ven dos bandas oscuras a cada lado de una banda clara. La anchura total de las diferentes membranas de mamíferos es de 7–10 nm, pero, algunas de ellas son significativamente más delgadas. Las membranas intracelulares son, normalmente, más delgadas que la membrana plasmática. Muchas membranas no tienen aspecto simétrico: la capa densa interior es a menudo más ancha que la capa densa exterior. Existe una asimetría química de la membrana. Con el desarrollo de técnicas sofisticadas para la preparación de muestras tisulares y para su tinción, incluidas la tinción negativa y la criofractura, se ha conseguido "ver" diversas superficies de membranas; a nivel molecular, las superficies no son lisas, sino punteadas, con componentes de forma globular que sobresalen de la membrana.

Las membranas son estructuras muy dinámicas con un movimiento que permite tanto a las células como a las estructuras subcelulares ajustar su forma y cambiar de posición. Los componentes químicos de la membrana, esto es, lípidos y proteínas, están adaptados de forma ideal para este papel dinámico. Se considera que las membranas son como un mar de lípidos en estado fluido en el cual tanto las proteínas como los lípidos pueden moverse e interaccionar.

Las membranas celulares controlan la composición del espacio que rodean, no sólo por su capacidad para excluir una serie de moléculas, sino también por la presencia de sistemas de transporte selectivos que permiten el movimiento de moléculas específicas de un lado al otro. Estos transportadores son proteínas. Al controlar la translocación de sustratos, cofactores e iones, las membranas modulan la concentración de las sustancias en los distintos compartimientos celulares, y, en consecuencia, influyen en las rutas metabólicas. Las hormonas, factores de crecimiento y reguladores metabólicos se unen a **receptores proteicos** específicos de las membranas plasmáticas (Capítulo 21) y la información de su presencia se transmite a la ruta metabólica adecuada desde los receptores de membrana mediante una serie de intermedios intracelulares, denominados **segundos mensajeros**. Las membranas plasmáticas desempeñan un papel en el reconocimiento intercelular, en el mantenimiento de la forma de la célula y en su movilidad.

La exposición que sigue se centra principalmente en la química y las funciones de transporte de las membranas, principalmente de células de mamíferos, pero las observaciones y actividades descritas son válidas para todas las membranas biológicas.

12.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MEMBRANAS

Los lípidos y proteínas son los dos componentes mayoritarios de las membranas, pero la proporción de cada uno varía según las membranas (Figura 12.2). El porcentaje de proteína oscila entre un 20% en la vaina de mielina y un 70% en la membrana interna de la mitocondria. Las proteínas son responsables de las funciones dinámicas de las membranas, por lo que cada membrana tiene una dotación de proteínas muy específica. Las membranas intracelulares tienen un alto porcentaje de proteína debido al elevado número de actividades enzimáticas de esas membranas. Las membranas

contienen también un pequeño porcentaje de diversos polisacáridos en forma de glucoproteína y glucolípido; no existen glúcidos libres en las membranas.

Los lípidos son componentes principales de las membranas

Los tres componentes lipídicos mayoritarios de las membranas eucarióticas son los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y el colesterol. Los glicerofosfolípidos y la esfingomielina, un esfingolípido que contiene fosfato, se clasifican como fosfolípidos. Las bacterias y las cianobacterias contienen glicerolípidos en los que un glúcido se une directamente al glicerol. Algunas membranas celulares también contienen pequeñas cantidades de otros lípidos, tales como derivados de triacilglicerol y diol (véase el Apéndice (p. 1175)) para sus estructuras), así como lípido unido covalentemente a proteínas.

Los glicerofosfolípidos son los lípidos más abundantes de las membranas

Los **glicerofosfolípidos** (**fosfoglicéridos**) tienen una molécula de glicerol con la que se esterifica un ácido fosfórico en el carbono α (Figura 12.3) y dos ácidos grasos de cadena larga en los carbonos restantes (Figura 12.4). Aunque el glicerol no contiene un carbono asimétrico, los carbonos α no son estereoquímicamente idénticos. La esterificación de un fosfato sobre un carbono α confiere asimetría a la molécula. Los glicerofosfolípidos que se encuentran en la naturaleza se designan con el sistema de numeración estereospecífico (*sn*) (Figura 12.3) que se expone en la p. 728.

El **1,2-diacilglicerol 3-fosfato**, o **ácido fosfatídico**, es el compuesto origen de una serie de glicerofosfolípidos, en los que diferentes compuestos que contienen hi-

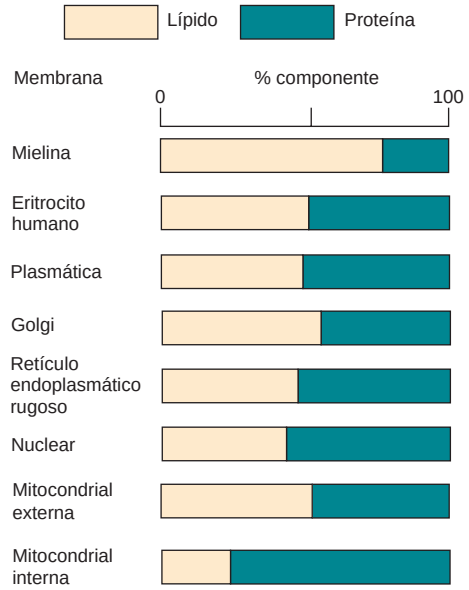


FIGURA 12.2
Valores representativos del porcentaje de lípido y proteína en diversas membranas celulares.
Los valores corresponden a hígado de rata, excepto para la mielina y la membrana plasmática de eritrocito humano. Los valores para el hígado de otras especies, entre ellas la humana, siguen un patrón similar.

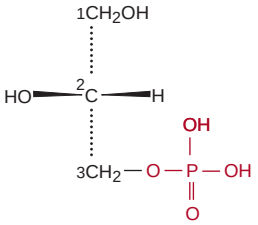


FIGURA 12.3
Configuración estereoquímica del L-glicerol 3-fosfato (*sn*-glicerol 3-fosfato).
El H y el OH unidos al C-2 están por encima del plano de la página y el C-1 y el C-3 por debajo.

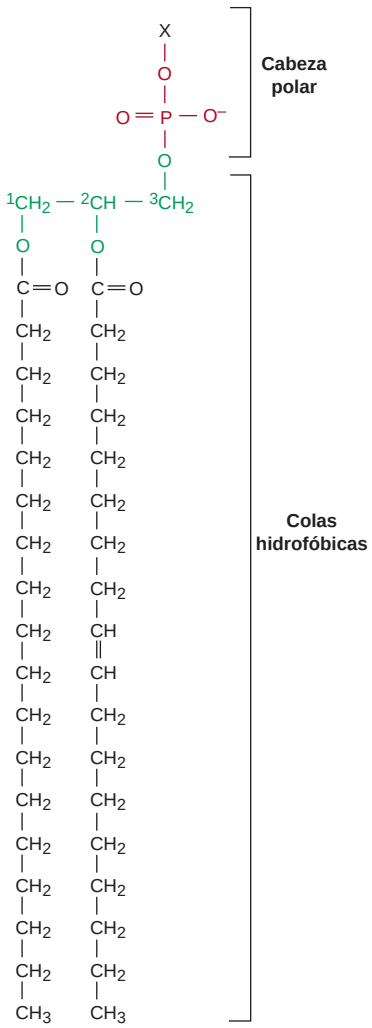


FIGURA 12.4
Estructura de un glicerofosfolípido.
Los ácidos grasos de cadena larga se esterifican en C-1 y C-2 del L-glicerol 3-fosfato. X puede ser un H (ácido fosfatídico), o uno de los diversos alcoholes que se muestran en la Figura 12.5.

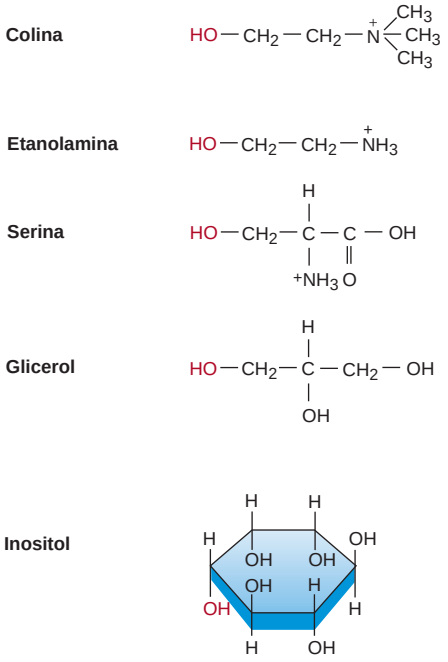


FIGURA 12.5
Estructuras de los principales alcoholes esterificados con el ácido fosfatídico para formar los glicerofosfolípidos.

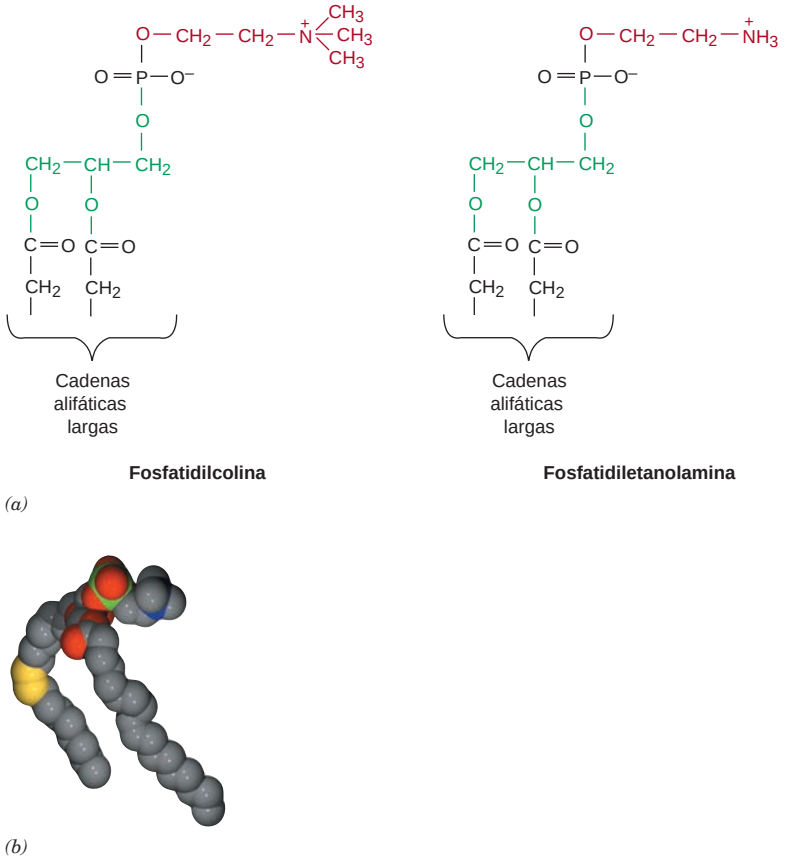


FIGURA 12.6
Glicerofosfolípidos comunes.
(*a*) Estructuras de los dos glicerofosfolípidos más frecuentes: fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. (*b*) Modelo espacial de la fosfatidilcolina: C, gris; C vinílico, amarillo; O, rojo; N, azul; y P, verde. No se muestran los H.
La Figura (b) ha sido cedida generosamente por Richard Pastor y Richard Venabler, FDA, Bethesda, Maryland.

droxilos, algunos de los cuales son polares, están esterificados con el grupo fosfato. Los principales compuestos unidos por el enlace fosfodiéster al glicerol son colina, etanolamina, serina, glicerol e inositol (véase Figura 12.5). La **fosfatidiletanolamina** (**glicerofosfolípido de etanolamina** o en nombre simplificado, **cefalina**) y la **fosfatidilcolina** (**glicerofosfolípido de colina** o **lecitina**) son los dos glicerofosfolípidos más frecuentes de las membranas (Figura 12.6). El **fosfatidilglicerol fosfoglicérido** (Figura 12.7) (**difosfatidilglicerol** o **cardiolipina**) contiene dos ácidos

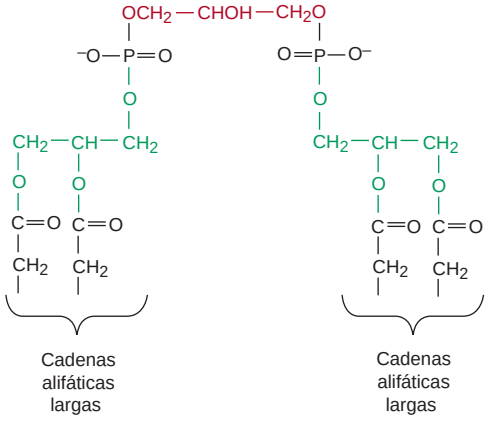


FIGURA 12.7
Fosfatidilglicerol fosfoglicérido (cardiolipina).

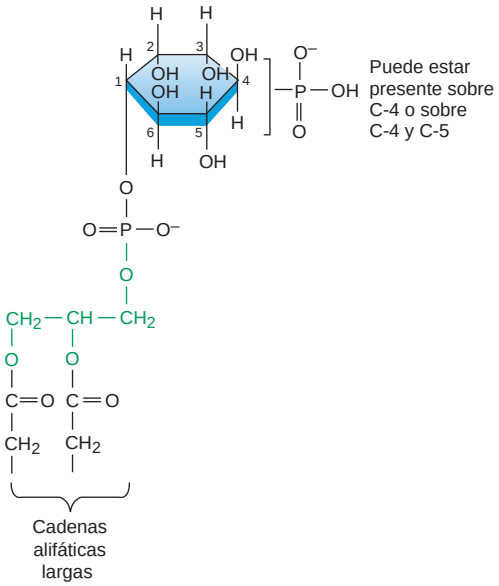


FIGURA 12.8
Fosfatidilinositol.
También se encuentran grupos fosfato sobre C-4 o sobre C-4 y C-5 del inositol. Los grupos fosfato adicionales incrementan la carga sobre la cabeza polar de este glicerofosfolípido.

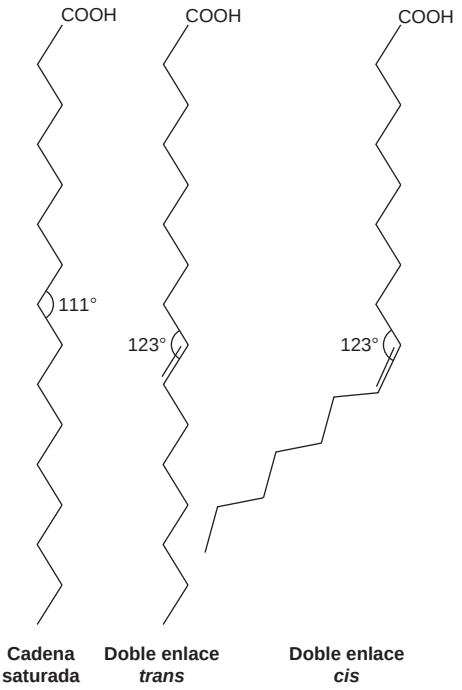


FIGURA 12.9
Conformación de los grupos acilo grasos de los fosfolípidos.
Los ácidos grasos saturados (palmítico) y los insaturados (palmitoleico) con dobles enlaces *trans* son cadenas rectas en su conformación de mínima energía, mientras que una cadena con un doble enlace *cis* (palmitoleico) tiene una curvatura. El doble enlace *trans* es raro entre los ácidos grasos naturales.

fosfatídicos unidos por un glicerol, y se encuentra casi exclusivamente en la membrana interna de la mitocondria y en las membranas bacterianas.

El inositol, un hexahidroxialcohol, está esterificado con el fosfato en el **fosfatidilinositol** (Figura 12.8). El 4-fosfo y los **4,5-bisfosfoinositol glicerofosfolípidos** (Figura 12.8) se encuentran en la membrana plasmática; el último es el precursor del inositol trifosfato y del diacilglicerol, conocidos como segundos mensajeros, que están implicados en la acción de algunas hormonas (véase p. 930).

Los glicerofosfolípidos contienen dos grupos acilo graso esterificados en los carbonos 1 y 2 del glicerol; en la Tabla 12.1 se presentan algunos de los ácidos grasos mayoritarios presentes en los glicerofosfolípidos. En el C-1 del glicerol se encuentra frecuentemente un ácido graso saturado y en el C-2 un ácido graso insaturado. La nomenclatura de los diferentes glicerofosfolípidos no especifica qué ácidos grasos están presentes. La fosfatidilcolina contiene usualmente ácido palmítico o esteárico en la posición *sn*-1 y un ácido graso insaturado de 18 carbonos, oleico, linoleico o linolénico en el carbono *sn*-2. La fosfatidiletanolamina también contiene ácido palmítico u oleico en *sn*-1, pero en *sn*-2 contiene un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, tal como el araquidónico.

Un ácido graso saturado, al igual que uno insaturado en posición *trans*, es una cadena lineal. La presencia de un doble enlace *cis* crea una torcedura en la cadena hidrocarbonada (Figura 12.9). Un diagrama de cadenas rectas, como los de las Figuras 12.4 y 12.9, no representa adecuadamente la configuración química de un ácido graso de cadena larga. En realidad, las cadenas hidrocarbonadas de los glice-

TABLA 12.1 Principales ácidos grasos en los glicerofosfolípidos

Nombre común	*Nombre sistemático*	*Fórmula estructural*
Ácido mirístico	*n*-Tetradecanoico	$CH_3—(CH_2)_{12}—COOH$
Ácido palmítico	*n*-Hexadecanoico	$CH_3—(CH_2)_{14}—COOH$
Ácido palmitoleico	*cis*-9-Hexadecenoico	$CH_3—(CH_2)_5—CH{=}CH—(CH_2)_7—COOH$
Ácido esteárico	*n*-Octadecanoico	$CH_3—(CH_2)_{16}—COOH$
Ácido oleico	Ácido *cis*-9-octadecenoico	$CH_3—(CH_2)_7—CH{=}CH—(CH_2)_7—COOH$
Ácido linoleico	Ácido *cis,cis*-9,12 octadecadienoico	$CH_3—(CH_2)_3—(CH_2—CH{=}CH)_2—(CH_2)_7—COOH$
Ácido linolénico	Ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico	$CH_3—(CH_2—CH{=}CH)_3—(CH_2)_7—COOH$
Ácido araquidónico	Ácido *cis,cis,cis,cis*-5,8,11,14-icosatetraenoico	$CH_3—(CH_2)_3—(CH_2—CH{=}CH)_4—(CH_2)_3—COOH$

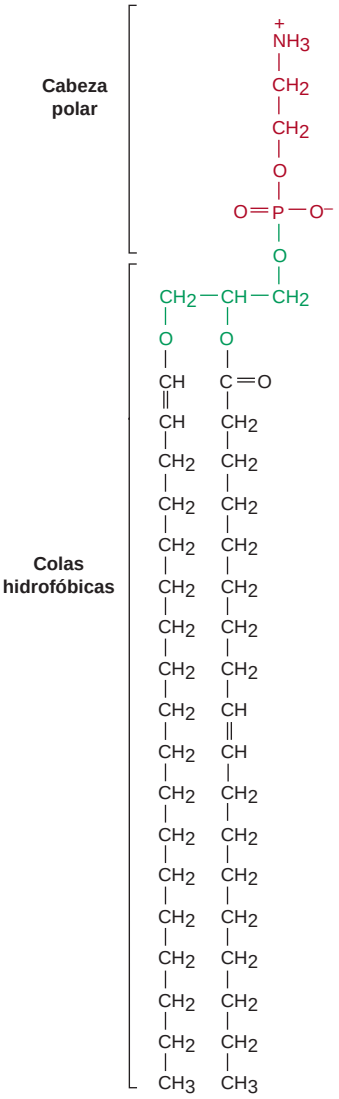


FIGURA 12.10
Plasmalógeno de etanolamina. Obsérvese el enlace éter de la cadena alifática con el C-1 del glicerol.

rofosfolípidos presentan un grado de enrollamiento elevado que se destruye por la presencia de un doble enlace. La presencia de ácidos grasos insaturados influye marcadamente en el estado fisicoquímico de la membrana (véase p. 509).

Los **glicerol éter fosfolípidos**, contienen una cadena alifática larga que se une mediante un enlace éter al glicerol en posición *sn*-1 (Figura 12.10). Los éter fosfolípidos contienen un grupo alquilo (alquilo acilglicerolfosfolípidos) o un éter α,β-insaturado, denominado **plasmalógeno**. Los plasmalógenos con etanolamina (**plasmalógeno de etanolamina**) o colina (**plasmalógeno de colina**) esterificados con el fosfato son abundantes en el tejido nervioso y en el corazón, pero no en el hígado. En el corazón humano, más del 50% de los glicerofosfolípidos de etanolamina son plasmalógenos. Se ha descrito la presencia de niveles elevados de lípidos con enlace éter en las membranas plasmáticas de células cancerosas con gran tendencia a metastatizar, lo que sugiere que pueden tener un papel en las propiedades invasivas de estas células.

Los glicerofosfolípidos son **anfipáticos**, esto es, contienen a la vez un extremo polar, o grupo de la cabeza, constituido por el fosfato cargado y por las sustituciones sobre el fosfato, y una cola no polar constituida por las cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas de los grupos acilo grasos. Los grupos polares están cargados a pH 7,0 con una carga negativa debido a la ionización del grupo fosfato (pK ~ 2) y las cargas de los grupos esterificados con el fosfato (Tabla 12.2). Los glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina son zwitteriones a pH 7,0 con una carga negativa sobre el fosfato y una carga positiva sobre el nitrógeno. La fosfatidilserina tiene una carga positiva sobre el grupo α-amino de la serina y dos cargas negativas, una sobre el fosfato y otra sobre el grupo carboxilo de la serina, con una carga neta negativa de −1 a pH 7,0. Por el contrario, los glicerofosfolípidos que contienen inositol y glicerol tienen una sola carga negativa sobre el fosfato; los derivados 4-fosfo- y 4,5-bisfosfoinositol son compuestos muy polares con cargas negativas sobre el fosfato.

Cada tipo de membrana celular tiene una composición determinada de ácidos grasos en sus glicerofosfolípidos. La composición de ácidos grasos de un mismo tejido en especies diferentes es muy similar. Además, el contenido en ácidos grasos de los glicerofosfolípidos puede variar según el estado fisiológico o patofisiológico del tejido.

Los esfingolípidos se encuentran en las membranas

Los aminoalcoholes **esfingosina** (D-4-esfingenina) y **dihidroesfingosina** (Figura 12.11) constituyen la base de los **esfingolípidos**. Las **ceramidas** tienen un ácido graso saturado o insaturado de cadena larga unido al grupo amino de una esfingosina mediante enlace amida (Figura 12.12). Una ceramida, provista de dos colas apolares, es similar en estructura al diacilglicerol. En el grupo hidroxilo polar de la posición 1 de las ceramidas se encuentran diversas sustituciones. La familia de la **esfingomielina** tiene fosforilcolina esterificando el hidroxilo-1 (Figura 12.13), y es el esfingolípido más abundante en los tejidos de mamíferos. La semejanza entre esta estructura y la de los glicerofosfolípidos de colina es patente, y tienen además muchas propiedades en común. Nótese que las esfingomielinas son compuestos anfi-

TABLA 12.2 Carga predominante sobre glicerofosfolípidos y esfingomielina a pH 7,0

Lípido	*Grupo fosfato*	*Base*	*Carga neta*
Fosfatidilcolina	− 1	+ 1	0
Fosfatidiletanolamina	− 1	+ 1	0
Fosfatidilserina	− 1	+ 1, − 1	− 1
Fosfatidilglicerol	− 1	0	− 1
Difosfatidilglicerol (cardiolipina)	− 2	0	− 2
Fosfatidilinositol	− 1	0	− 1
Esfingomielina	− 1	+ 1	0

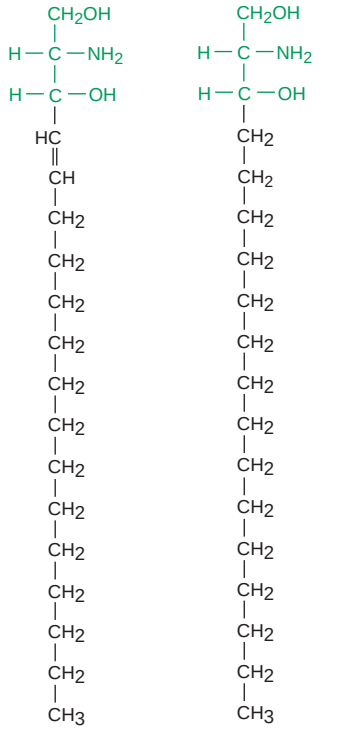


FIGURA 12.11
Estructuras de la esfingosina y dihidroesfingosina.

páticos con un fosfato cargado. Las esfingomielinas y los glicerofosfolípidos se clasifican como fosfolípidos. La esfingomielina de la mielina contiene predominantemente los ácidos grasos de cadena más larga, con longitudes de 24 carbonos; al igual que con los glicerofosfolípidos, existe una composición de ácidos grasos de la esfingomielina específica en función del tejido.

Los **glucoesfingolípidos** tienen un azúcar unido mediante enlace β-glucosídico al grupo 1-hidroxilo de la esfingosina en las ceramidas; no contienen fosfato y son eléctricamente neutros. Un subgrupo es el de los **cerebrósidos**, que contienen glucosa (**glucocerebrósidos**) o galactosa (**galactocerebrósidos**) unida a una ceramida. La Figura 12.14 presenta la estructura de la **frenosina**, un galactocerebrósido con un 2-hidroxiácido graso de 24 carbonos. Los galactocerebrósidos se encuentran predominantemente en el cerebro y el tejido nervioso, mientras que las pequeñas cantidades de cerebrósidos presentes en el tejido no nervioso contienen usualmente glucosa. Los galactocerebrósidos que contienen un grupo sulfato esterificado en la posición 3 se denominan sulfátidos (Figura 12.15). Los cerebrósidos y sulfátidos contienen normalmente ácidos grasos de 22 a 26 átomos de carbono.

Los glucoesfingolípidos neutros poseen a menudo, en lugar de monosacáridos, 2 (dihexósidos), 3 (trihexósidos) o 4 (tetrahexósidos) residuos glucídicos unidos al grupo 1-hidroxilo de la esfingosina. Los azúcares más frecuentes son la diglucosa, la digalactosa, la ***N*-acetilglucosamina** y la ***N*- acetildigalactosamina**.

El grupo más complejo de glucoesfingolípidos son los **gangliósidos**, que contienen un grupo oligosacárido con uno o más residuos de **ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)**; son compuestos anfipáticos con una carga negativa a pH 7,0. Los gangliósidos representan entre el 5–8% de los lípidos totales en el cerebro, habiéndose identificado unos 20 tipos diferentes según el número y posición relativa de los residuos de hexosa y de ácido siálico. En la p. 760 se presenta una descripción detallada de la nomenclatura y estructuras de los gangliósidos. La porción glucídica de los gangliósidos se extiende más allá de la superficie de la membrana, está implicada en el reconocimiento intercelular y sirve como sitio de unión de hormonas y toxinas bacterianas como, por ejemplo, la toxina del cólera.

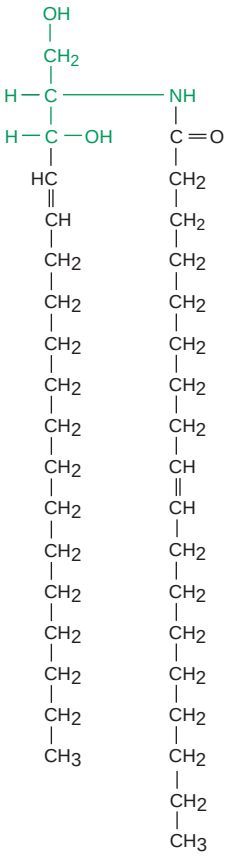
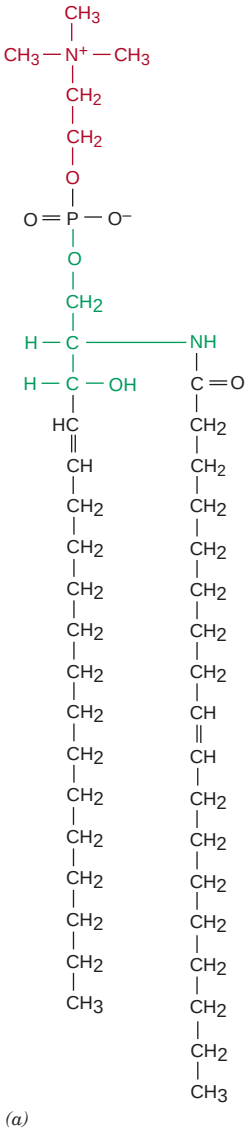
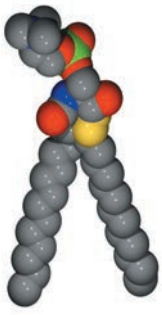


FIGURA 12.12
Estructura de una ceramida.



(a)



(b)

FIGURA 12.13
Esfingomielina.
(*a*) Estructura de una esfingomielina que contiene colina. (*b*) Modelo espacial con C en gris, C de vinilo en amarillo, O en rojo, N en azul y P en verde. No se muestran los H.
Figura (b) proporcionada generosamente por Richard Pastor y Richard Venabler, FDA, Bethesda, Maryland.

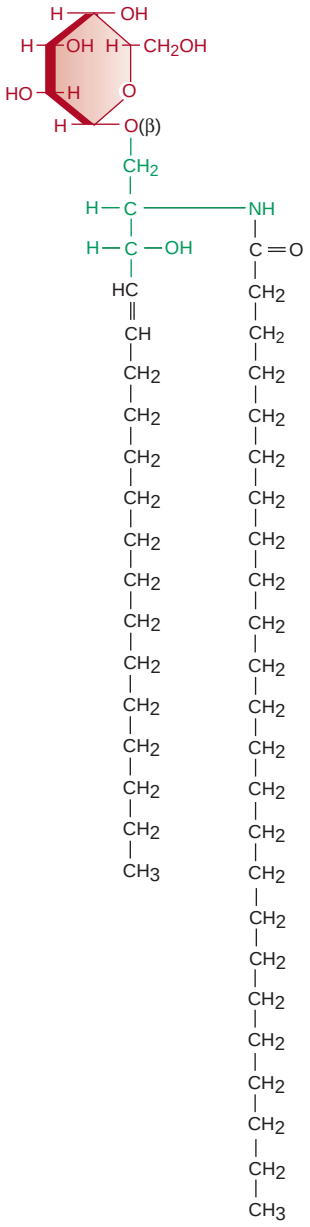


FIGURA 12.14
Estructura de un galactocerebrósido que contiene un ácido graso de 24 carbonos.

El colesterol es un componente importante de las membranas plasmáticas

El colesterol es el tercer lípido mayoritario presente en las membranas. Es una molécula hidrofóbica, rígida y compacta con cuatro anillos fundidos y una cadena hidrocarbonada ramificada de ocho carbonos unida al anillo D en la posición 17 (Figura 12.16). El colesterol presenta también un grupo hidroxilo polar en el C-3. El colesterol altera la fluidez de las membranas y participa en el control de la microestructura de las membranas plasmáticas (véase p. 510).

La composición lipídica varía según las membranas

Las distintas membranas celulares de cada tejido tienen una composición de lípidos característica (Figura 12.17). Entre especies existe un gran parecido en la composición lipídica de la misma membrana intracelular de un tejido específico. La

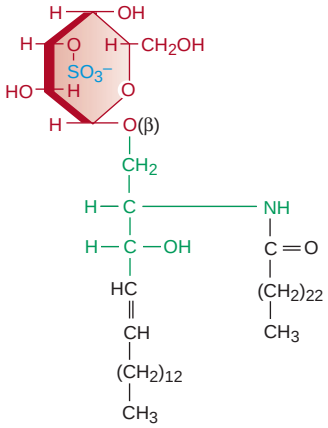


FIGURA 12.15
Estructura de un sulfátido.

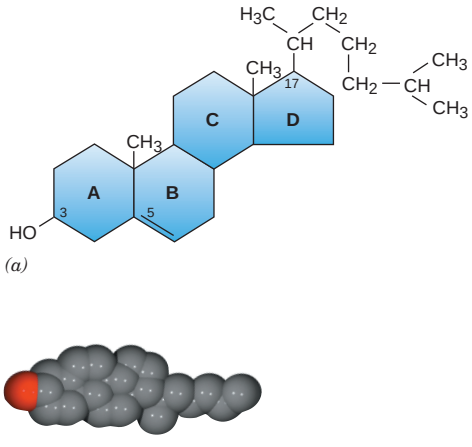


FIGURA 12.16
Colesterol.
(*a*) Estructura del colesterol. (*b*) Modelo espacial con C en gris y O en rojo. No se muestran los H. *La Figura (b) ha sido proporcionada generosamente por Richard Pastor y Richard Venable, FDA, Bethesda, Maryland.*

membrana plasmática es la que muestra la mayor variación en composición porcentual, debido a que la cantidad de colesterol está afectada por el estado nutricional del animal. Las membranas de mielina de los axones del tejido nervioso son ricas en esfingolípidos con una proporción elevada de glucoesfingolípidos. Las membranas intracelulares contienen principalmente glicerofosfolípidos con pocos esfingolípidos. La composición lipídica de las membranas mitocondriales, de las nucleares y del retículo endoplasmático rugoso son parecidas; la membrana de Golgi es en cierta manera un intermedio entre las demás membranas intracelulares y la membrana plasmática. La cantidad de cardiolipina es elevada en la membrana mitocondrial interna y baja en la externa, y es prácticamente inexistente en las restantes membranas. Predominan los lípidos que contienen colina —fosfatidilcolina y esfingomielina— y, en segundo lugar, se encuentra el glicerofosfolípido de etanolamina. La constancia en la composición de las diversas membranas indica la relación entre los lípidos y las funciones específicas de las membranas concretas.

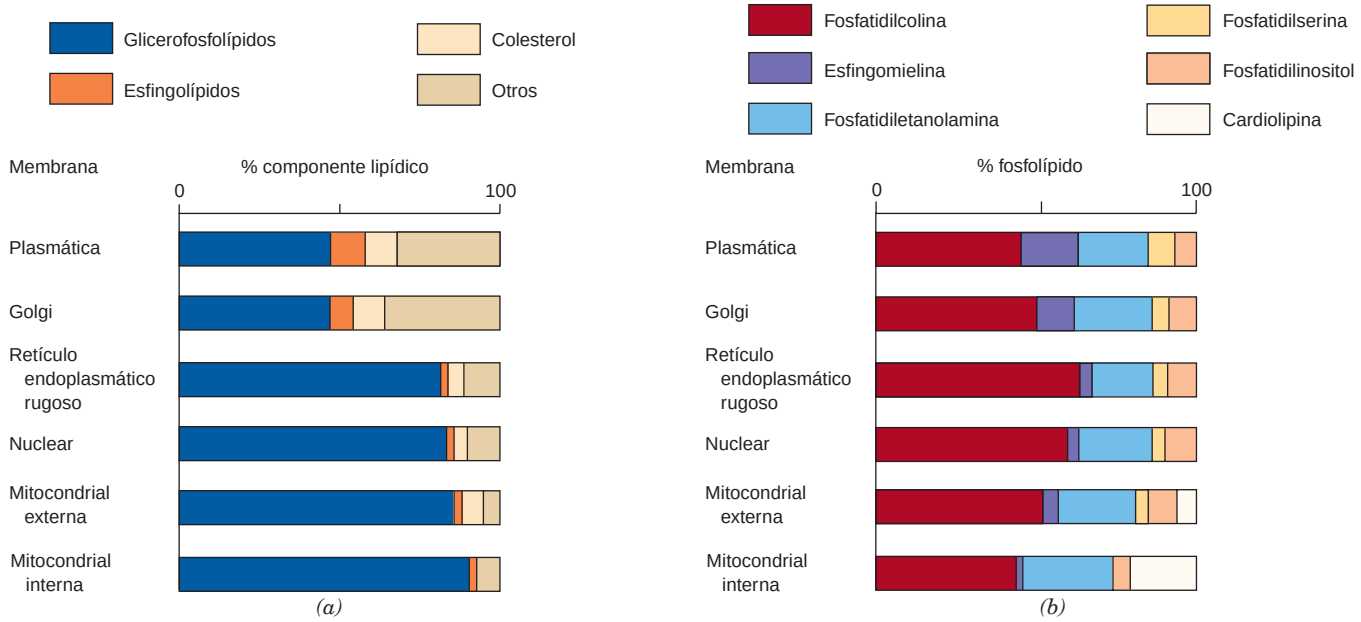
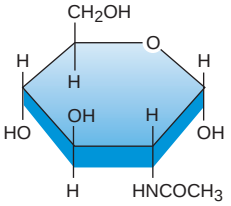
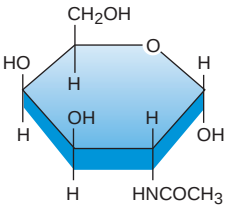


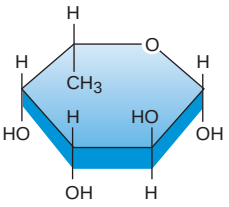
FIGURA 12.17
Composición lipídica de membranas celulares aisladas del hígado de rata.
(*a*) Cantidad de componentes lipídicos mayoritarios en porcentaje del lípido total. El área marcada "Otros" incluye mono-, di- y triacilglicerol, ácidos grasos y ésteres del colesterol. (*b*) Composición de fosfolípidos en porcentaje del fosfolípido total.
Valores de R. Harrison y G. G. Lunt, Biological Membranes, *Wiley, New York, 1975.*



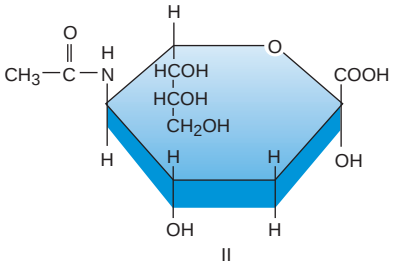
***N*-Acetil-α-D-glucosamina**



***N*-Acetil-α-D-galactosamina**



α-L-Fucosa



Ácido *N*-acetil-D-neuramínico

FIGURA 12.18
Estructura de algunos glúcidos de membrana.

Las proteínas de membrana se clasifican según su facilidad de extracción

Las proteínas de las membranas se clasifican según la facilidad con que se extraen a partir de fracciones de membranas aisladas. Las **proteínas periféricas** (o **extrínsecas**) se liberan por tratamiento de la membrana con soluciones salinas de diferente fuerza iónica, o pH extremos. Se utiliza este nombre para señalar una localización física en la superficie de la membrana. Las proteínas periféricas aisladas, muchas de ellas con actividad enzimática, son normalmente solubles en agua. Las **proteínas integrales** (o **intrínsecas**) requieren un tratamiento más bien drástico, tal como el uso de detergentes o disolventes orgánicos, para extraerlas de la membrana. Habitualmente contienen lípidos fuertemente unidos, que al ser eliminados provocan la desnaturalización de la proteína y la pérdida de su actividad biológica. Las proteínas integrales tienen secuencias de aminoácidos hidrofóbicos que crean dominios hidrofóbicos en la estructura terciaria de la proteína. Estos dominios interaccionan con los hidrocarburos hidrofóbicos de los lípidos estabilizando el complejo lípido–proteína. La extracción de las proteínas integrales destruye la membrana, mientras que las proteínas periféricas pueden extraerse con pocos cambios, si los hay, en la integridad de la membrana.

Los **proteolípidos** son lipoproteínas hidrofóbicas solubles en cloroformo y metanol, pero insolubles en agua. Los proteolípidos están presentes en muchas membranas, pero son especialmente abundantes en la mielina, en donde representan alrededor del 50% del componente proteico. Un ejemplo de ello es la **lipofilina**, una lipoproteína mayoritaria de la mielina cerebral, que contiene un 65% de aminoácidos hidrofóbicos y ácidos grasos unidos covalentemente.

Otro tipo de proteínas integrales de membrana son las **glucoproteínas**. Las membranas plasmáticas poseen una serie de glucoproteínas diferentes, cada una de ellas con su propio contenido glucídico.

Se están empezando a conocer la complejidad, variedad e interacción de las glucoproteínas de la membrana con los lípidos. Muchas de las proteínas de membrana son enzimas localizados dentro o sobre las membranas celulares. Las proteínas de las membranas desempeñan un papel en los movimientos transmembrana de las moléculas y como receptores para la unión de hormonas y factores de crecimiento. En muchas células, tales como las neuronas y los eritrocitos, las proteínas de membrana desempeñan un papel estructural en el mantenimiento de la forma de la célula.

Los glúcidos de las membranas se presentan en forma de glucoproteínas o glucolípidos

En la membrana, los glúcidos se encuentran en forma de oligosacáridos unidos covalentemente a proteínas, formando así las glucoproteínas, y, en menor medida, unidos a lípidos, dando así lugar a glucolípidos. Entre los azúcares que se encuentran en las glucoproteínas y glucolípidos están la glucosa, la galactosa, la manosa, la fucosa, la *N*-acetilgalactosamina, la *N*-acetilglucosamina y el ácido siálico (sus estructuras se pueden apreciar en la Figura 12.18 y en el Apéndice). En las pp. 679 y 756 se presentan las estructuras de las glucoproteínas y los glucolípidos, respectivamente. El glúcido se encuentra en la cara exterior de la membrana plasmática o vueltos hacia la luz del retículo endoplasmático. Los glúcidos de membrana intervienen en el reconocimiento intercelular, la adhesión y la acción de los receptores.

12.3 | MICELAS Y LIPOSOMAS

Los lípidos forman estructuras vesiculares

Las características estructurales básicas de las membranas derivan de las propiedades fisicoquímicas de los componentes lipídicos mayoritarios, los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos. En las concentraciones adecuadas, estos compuestos anfipáticos, provistos de una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica (Figura 12.19*a*), interaccionan en un sistema acuoso *in vitro* formando esferas, denominadas **micelas** (Figura 12.19*b*). Las cabezas polares cargadas se disponen hacia el exterior de la esfera, mientras que las colas hidrofóbicas interaccionan excluyendo el agua. La concentración específica de lípidos requerida para la formación de micelas se denomina concentración micelar crítica. Se pueden preparar micelas constituidas por un único tipo de lípidos o bien por una mezcla de varios. La formación de la micela depende también

de la temperatura del sistema y, si se ha utilizado una mezcla de lípidos, de la proporción de concentraciones de los diferentes lípidos de la mezcla (véase p. 1107). La estructura micelar es muy estable debido a las interacciones hidrofóbicas de las cadenas hidrocarbonadas y la atracción de los grupos polares hacia el agua. Las micelas son importantes en la digestión intestinal de los lípidos (véase p. 1108).

Las membranas de los liposomas son similares a las membranas biológicas

En determinadas condiciones, los lípidos anfipáticos, tales como los glicerofosfolípidos forman una estructura bimolecular con dos capas de lípido. Los grupos de las cabezas polares están en la interfase situada entre el medio acuoso y el lípido, y las colas hidrofóbicas interaccionan formando un entorno que excluye el agua (Figura 12.19*c*). Esta conformación de bicapa es la estructura lipídica básica de todas las membranas biológicas.

Las bicapas lipídicas son estructuras extremadamente estables, mantenidas por las fuerzas hidrofóbicas de las cadenas hidrocarbonadas y las interacciones iónicas de las cabezas cargadas con el agua. De las interacciones de las cadenas hidrocarbonadas resulta la menor área posible de éstas que esté en contacto con el agua, quedando así el agua excluida del interior de la bicapa. Si se disgrega, la bicapa muestra una tendencia a autoensamblarse, ya que los grupos hidrofóbicos intentan establecer una estructura en la que se minimice el contacto entre el agua y las cadenas hidrocarbonadas, situación que es la más favorable desde el punto de vista termodinámico. Una bicapa lipídica se cierra sobre sí misma formando una vesícula esférica que separa el espacio externo del compartimiento acuoso interno. Estas vesículas se denominan **liposomas**. Dado que las interacciones individuales lípido–lípido tienen bajas energías de activación, los lípidos de una bicapa poseen una movilidad limitada: interrumpen y establecen interacciones con las moléculas circundantes, pero son incapaces de escapar fácilmente de la bicapa lipídica (Figura 12.19*d*). La capacidad de los lípidos anfipáticos de autoensamblarse en bicapas es una propiedad importante, e interviene en la formación de membranas celulares.

Las moléculas de fosfolípidos individuales intercambian fácilmente su posición con la de moléculas vecinas, lo que provoca una rápida difusión lateral en el plano de la membrana (véase Figura 12.20). Las cadenas aciladas grasas giran alrededor de sus enlaces carbono–carbono; de hecho, la rotación es mayor cerca del metilo terminal, dando lugar a que la movilidad sea mayor en el centro que en la región periférica de la bicapa lipídica. Sin embargo, las moléculas lipídicas individuales no pueden migrar fácilmente de una monocapa a la otra, movimiento transversal llamado "flip-flop", a causa de las limitaciones temodinámicas sobre el movimiento del grupo de la cabeza cargado a través de la zona central lipofílica. Así, las bicapas li-

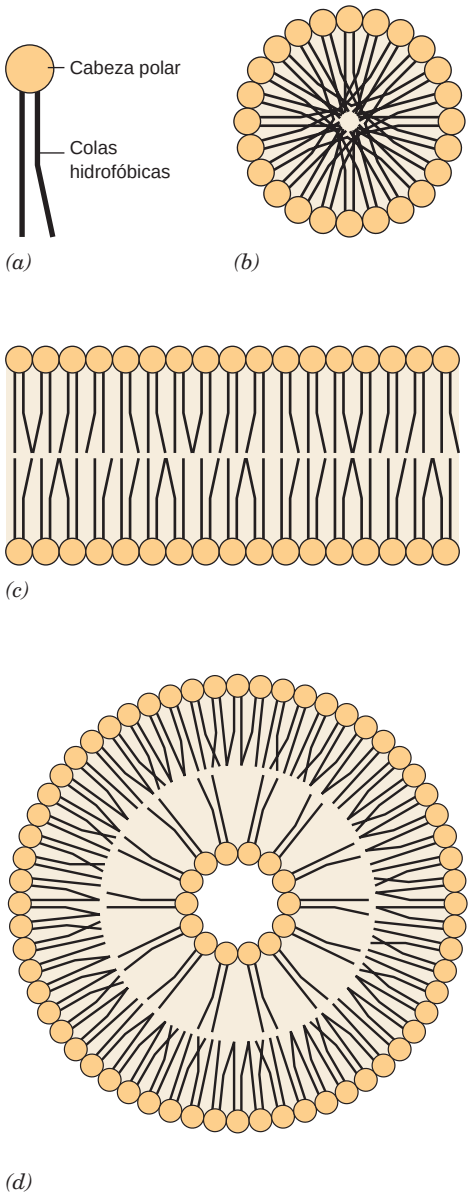


FIGURA 12.19
Interacciones de fosfolípidos en un medio acuoso.
(*a*) Representación de un lípido anfipático. (*b*) Sección transversal de la estructura de una micela. (*c*) Sección transversal de la estructura de una bicapa lipídica. (*d*) Sección transversal de un liposoma. Cada estructura tiene una estabilidad inherente debida a la interacción hidrofóbica de las cadenas hidrocarbonadas y a la atracción de los grupos de las cabezas polares hacia el agua.

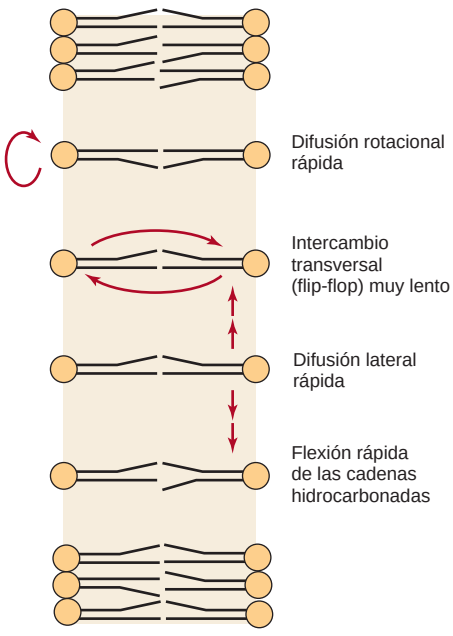


FIGURA 12.20
Movilidad de los componentes lipídicos de las membranas.

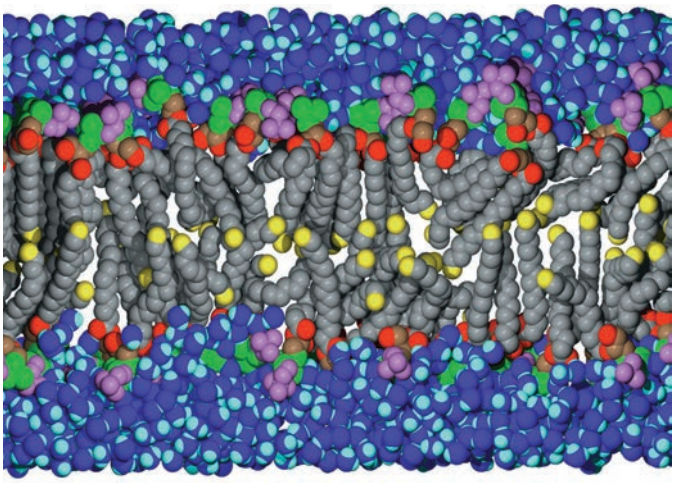
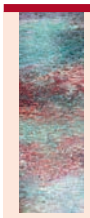


FIGURA 12.21
Modelo de una bicapa lipídica detenida en un momento dado.
Modelo obtenido mediante ordenador de una bicapa artificial consistente en dipalmitil fosfatidilcolina rodeada por agua. Los colores de los átomos son: C, gris (excepto el C del metilo terminal que es amarillo y el glicerol marrón); O del éster, rojo; P y O, verde; C y N de la colina, violeta pálido; O del agua, azul oscuro; y H del agua, azul claro. Los H del lípido se han omitido.
Figura proporcionada generosamente por Richard Pastor y Richard Venable, FDA, Bethesda, Maryland.

pídicas poseen una estabilidad y un estado de fluidez inherentes tales que las moléculas individuales se desplazan rápidamente por su propia monocapa, pero no se intercambian fácilmente con la monocapa adyacente. En las bicapas artificiales compuestas de diferentes lípidos, éstos se distribuyen al azar entre las monocapas.

La interacción de los lípidos en las membranas es muy diferente de la ilustrada en la Figura 12.19. El interior de las bicapas de la membrana es muy fluido y está en constante movimiento. Las cadenas acílicas de los fosfolípidos tienen un movimiento al azar y se intercalan con cadenas de la superficie opuesta. Cerca de los grupos de la cabeza de los lípidos la viscosidad aumenta significativamente. En la Figura 12.21 se muestra una representación por ordenador de la disposición de los fosfolípidos en una bicapa en un momento determinado. La superficie de la membrana está cubierta por varias capas de moléculas de agua ordenadas que influyen en el entorno de una membrana.

Para comprender las propiedades de las membranas biológicas se han estudiado ampliamente sistemas de membrana artificial. Existe una multitud de técnicas que utilizan fosfolípidos sintéticos y lípidos extraídos de membranas naturales para preparar liposomas. Según el procedimiento, pueden prepararse vesículas unilamelares o multilamelares (vesículas dentro de vesículas) de diversos tamaños (de 20 nm a 1 μm de diámetro). La Figura 12.19*d* representa la estructura de un liposoma. El interior de la vesícula es un entorno acuoso, y es posible preparar liposomas con distintas sustancias atrapadas. Tanto el entorno externo como el interno del liposoma puede ser manipulado, lo que permite llevar a cabo estudios sobre una serie de propiedades de estas membranas sintéticas, entre ellas su capacidad para excluir moléculas, su interacción con diversas sustancias y su estabilidad en diferentes condiciones. El Na^+, K^+, Cl^- y la mayoría de las moléculas polares no difunden fácilmente a través de la bicapa lipídica de los liposomas. Las sustancias apolares liposolubles, tales como los triacilgliceroles y los ácidos orgánicos sin disociar difunden fácilmente dentro de la bicapa y permanecen en el entorno hidrofóbico de las cadenas hidrocarbonadas. De diversos tejidos se han aislado enzimas ligados a la membrana y proteínas implicadas en la translocación de iones, que luego han sido incorporados a la membrana de los liposomas para evaluar su función. Con los liposomas es más fácil evaluar los diversos parámetros de los sistemas de membrana, lo que permite estudiar las diferentes actividades libres de posibles interferencias provocadas por reacciones presentes en las membranas celulares. Los liposomas también se utilizan en la administración de fármacos a los seres humanos (Apli. Clín. 12.1) y se han estudiado como vectores para la terapia génica.



APLICACIÓN CLÍNICA 12.1
Los liposomas como transportadores de fármacos y enzimas

Un obstáculo de gran importancia en el uso de muchos fármacos es la falta de especificidad tisular en la acción del mismo. Los fármacos administrados por vía oral o intravenosa actúan a menudo en muchos tejidos, y no exclusivamente sobre el órgano diana, lo que puede provocar efectos secundarios tóxicos. Un ejemplo es la supresión de las células de la médula ósea que se observa habitualmente en tratamientos con fármacos antitumorales. Además, algunos fármacos son metabolizados rápidamente y su período de efectividad es relativamente corto. Se han preparado liposomas con fármacos, enzimas y DNA encapsulados en su interior y utilizados como portadores de estas sustancias hasta los órganos diana. Los liposomas preparados con fosfolípidos purificados y colesterol son atóxicos y biodegradables. La modificación de las cargas superficiales estimula la incorporación y liberación del fármaco. Se han hecho intentos de preparar liposomas para que interaccionen con un órgano diana específico. Se ha comprobado la efectividad de la administración mediante liposomas de agentes antibióticos, antineoplásicos, antipalúdicos, antivíricos, antifúngicos y antiinflamatorios. Algunos fármacos tienen un período de efectividad más largo cuando se administran encapsulados en liposomas. Se espera que sea posible preparar liposomas con un alto grado de especificidad tisular y quizás que incluso se pueda realizar la administración de fármacos y terapia de reemplazamiento enzimático con esta técnica.

Ranade, V. V. Drug delivery systems. 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. *J. Clin. Pharmacol.* 29:685, 1989; Caplen, N. J., Gao, X., Hayes, P., et al. Gene therapy for cystic fibrosis in humans by liposome-mediated DNA transfer: the production of resources and the regulatory process. *Gene Ther.* 1:139, 1994; Desormeaux, A. y Bergeron, M. G. Liposomes in drug delivery systems: a strategic approach for the treatment of HIV infection. *J. Drug Targeting* 6:1, 1998: y Gregoriadis, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.* 13:527, 1995.

12.4 ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Modelo de mosaico fluido de las membranas biológicas

El conocimiento de la estructura de las membranas ha evolucionado basándose en las pruebas aportadas por las investigaciones fisicoquímicas, bioquímicas y de microscopia electrónica. Al igual que los liposomas, todas las membranas biológicas presentan un ordenamiento de los lípidos en forma de bicapa. Los lípidos anfipáticos y el colesterol están orientados de manera que las porciones hidrofóbicas interaccionen minimizando su contacto con el agua u otros grupos polares, y los grupos de las cabezas polares de los lípidos se encuentren en la interfase con el entorno acuoso. J. D. Davson y J. Danielli propusieron en 1935 este modelo que fue refinado más adelante por J. D. Robertson. Un problema central en los primeros modelos era cómo explicar la interacción de las proteínas de membrana con la bicapa lipídica. A principios de la década de 1970, S. J. Singer y G. L. Nicolson propusieron el **modelo de mosaico fluido** para las membranas en el que algunas proteínas (intrínsecas) están realmente inmersas en la bicapa lipídica, mientras otras (extrínsecas) se hallan unidas débilmente a la superficie. Se sugirió que algunas proteínas abarcarían la bicapa lipídica y estarían en contacto con los ambientes acuosos de ambos lados. Se propuso que tanto lípidos como proteínas difunden lateralmente. La Figura 12.22 es una representación actual de una membrana biológica. Las características de la bicapa lipídica explican muchas de las propiedades de las membranas celulares, como su fluidez, su flexibilidad, que permite cambios de forma, su capacidad de autocerrarse y su impermeabilidad. El modelo es aún objeto de modificaciones y refinamientos; así, ahora se considera que los lípidos pueden adoptar dominios estructurales no lamelares y que las largas cadenas acilo de una capa pueden interdigitarse con las de la capa opuesta.

Las proteínas integrales de membrana están sumergidas en la bicapa lipídica

El desarrollo de técnicas de aislamiento de **proteínas integrales de membrana**, de determinación de su estructura primaria, y de identificación de dominios funciona-

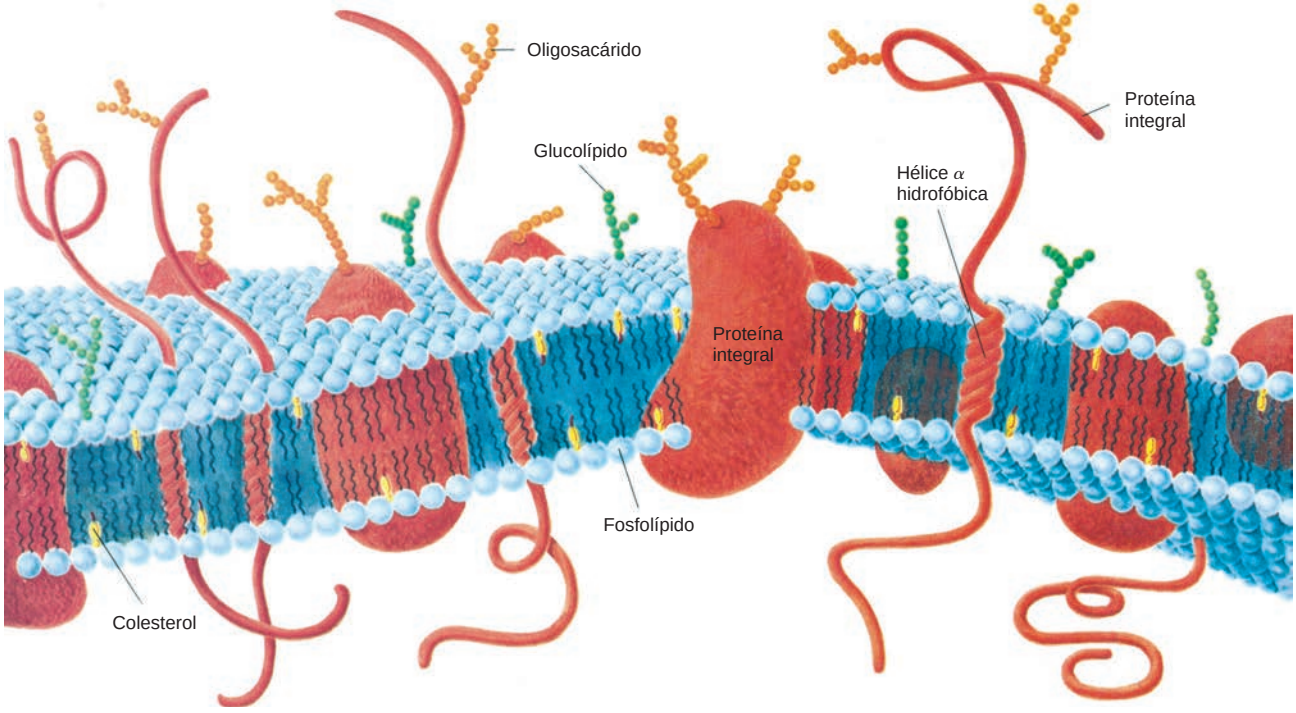


FIGURA 12.22
Modelo de mosaico fluido de las membranas biológicas.
Tomado de D. Voet y J. Voet, Biochemistry, *2nd ed. New York: Wiley, 1995. Reproducida con permiso de John Wiley & Sons, Inc.*

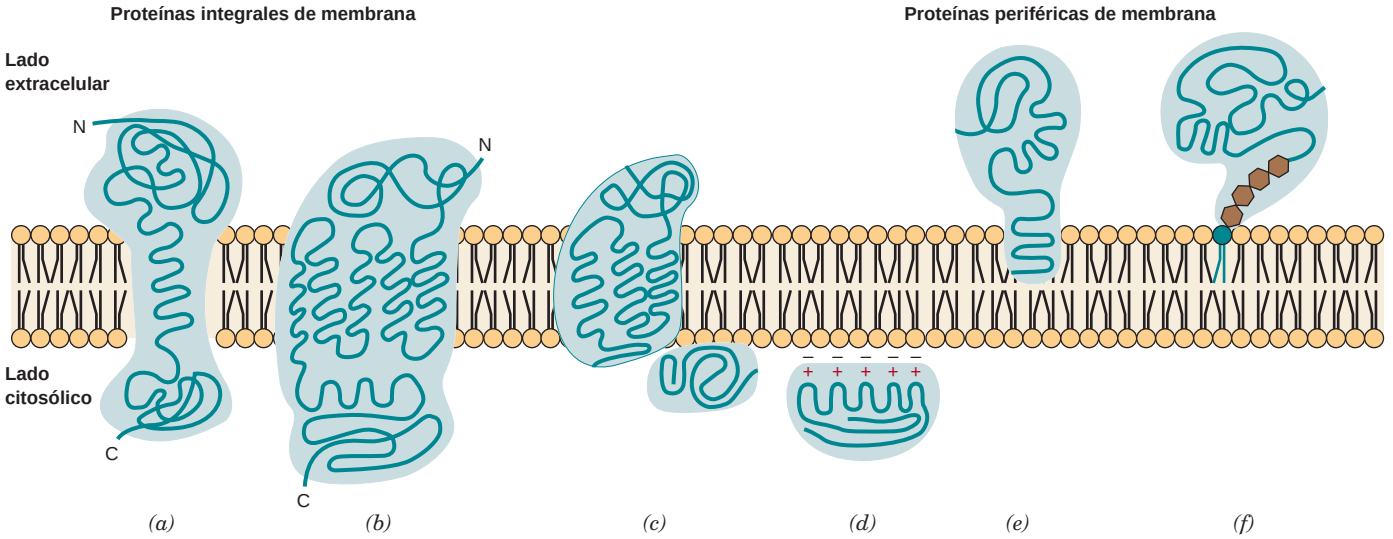


FIGURA 12.23
Interacciones de las proteínas de membrana con la bicapa lipídica.
El dibujo muestra los diversos tipos de unión de las proteínas a la bicapa lipídica. (*a*) Un único segmento transmembrana; (*b*) segmentos transmembrana múltiples; (*c*) unión a una proteína integral; (*d*) unión electrostática a la bicapa lipídica; (*e*) sujeción mediante una secuencia terminal corta de aminoácidos hidrofóbicos y (*f*) sujeción mediante un lípido unido convalentemente.

les específicos ha permitido comprender la relación estructural entre la bicapa lipídica hidrofóbica y las proteínas de membrana. La Figura 12.23 ilustra las diversas formas de unión de las proteínas a una membrana biológica. Algunas proteínas integrales de membrana (véase p. 502) abarcan la membrana, mientras que otras sólo están parcialmente inmersas en la bicapa. Las secuencias de aminoácidos incrustados en la membrana se han determinado gracias a medidas de la hidrofobicidad de residuos aminoácidos y a la digestión proteolítica parcial de las proteínas. Algunas proteínas contienen una estructura α-helicoidal formada básicamente por aminoácidos hidrofóbicos (tales como leucina, isoleucina, valina y fenilalanina), que es la secuencia transmembrana. Esto se muestra en la Figura 12.23*a*. Un ejemplo de estas proteínas es la **glicoforina**, un polipéptido de 131 aminoácidos de la membrana plasmática de los eritrocitos humanos; los residuos aminoácidos 73–91 constituyen la secuencia transmembrana, y son mayoritariamente hidrofóbicos. La glicoforina tiene tres dominios: una secuencia externa a la célula, que contiene el extremo amino, la secuencia transmembrana y una secuencia que se extiende hacia el interior de la célula con el extremo carboxilo. En otras proteínas transmembrana, la cadena de aminoácidos se dobla y atraviesa varias veces la membrana (Figura 12.23*b*). En ciertos casos hay 12 segmentos que cruzan la bicapa lipídica. A menudo, estas hélices α múltiples que atraviesan la membrana se organizan en forma de estructura tubular. Éste es el caso del **canal aniónico** de los eritrocitos humanos, que tiene 926 aminoácidos y es el responsable del intercambio del Cl^- y HCO_3^- a través de la membrana (véase p. 520). Las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas son determinantes de la topografía de la proteína en la membrana. Algunas proteínas forman en la membrana una estructura cuaternaria con múltiples subunidades.

Las proteínas integrales de membrana pueden contener dominios específicos, para la unión a ligandos, actividad catalítica y unión de glúcidos o lípidos. El canal aniónico del eritrocito tiene dos dominios principales: uno hidrofílico amino terminal, localizado en la cara citosólica de la membrana que contiene los sitios de unión de la anquirina, una proteína que ancla el citoesqueleto y de otras proteínas citosólicas, y un dominio de 509 aminoácidos que atraviesa la membrana 12 veces e interviene en el intercambio de Cl^- y HCO_3^-. La glicoforina contiene un 60% de glúcido, enlazado exclusivamente al dominio proteico de la cara extracelular de la membrana. Las proteínas integrales tienen una orientación definida, y no fortuita, en la membrana. Esta orientación estructural definida tanto de lípidos como de proteínas ilustra otro aspecto importante de la estructura de las membranas: las membranas biológicas son asimétricas, de forma que cada superficie tiene características

específicas. La orientación de las proteínas se determina durante la síntesis de la membrana o el recambio de la proteína; el gran tamaño de las proteínas y ciertas restricciones termodinámicas impiden su movimiento transversal (flip-flop).

Muchos enzimas que son proteínas integrales de membrana requieren para su actividad la presencia de un lípido de membrana. Por ejemplo, la D-β-hidroxibutirato deshidrogenasa, que se localiza en la membrana mitocondrial interna, requiere fosfatidilcolina para ser activa, y la Ca^{2+}-ATPasa del retículo sarcoplasmático del músculo esquelético tiene un sitio de unión específico de lípido. El colesterol está implicado en la actividad de varias bombas iónicas de la membrana, tales como las Na^+, K^+-ATPasas (véase p. 522), las ATPasas transportadoras de Ca^{2+} (véase p. 523) y los receptores de acetilcolina. Algunos de estos efectos moduladores de los lípidos pueden ser el reflejo de un cambio en la ordenación y fluidez de la membrana, pero los lípidos también podrían tener una influencia directa en la actividad.

Las proteínas periféricas de membrana tienen diversos modos de anclaje

Las **proteínas periféricas de membrana** se unen débilmente a éstas, y si se extraen, la bicapa lipídica no resulta alterada. Algunas se unen a proteínas integrales de membrana, como por ejemplo la **anquirina** unida a la proteína del canal aniónico en los eritrocitos (Figura 12.23*c*). Los fosfolípidos de la membrana, cargados negativamente, interaccionan con regiones cargadas positivamente de proteínas, permitiendo una unión electrostática (Figura 12.23*d*). Algunas proteínas periféricas tienen secuencias de aminoácidos hidrofóbicos en un extremo de la cadena peptídica que sirven de ancla en los lípidos de membrana (Figura 12.23*e*); el citocromo b_5 se une al retículo endoplasmático mediante un ancla de ese tipo.

El fosfatidilinositol también ancla proteínas a membranas (Figuras 12.23*f* y 12.24). Un **glucano**, formado por etanolamina, fosfato, manosa, manosa, manosa y glucosamina, se halla unido covalentemente al grupo carboxilo terminal de la proteína. Este glucano se ha conservado a lo largo de la evolución, pues se ha encontrado en diferentes especies unido a residuos carboxi-terminales de distintas proteínas de membrana. Otros glúcidos pueden estar enlazados a la última manosa. La glucosamina del glucano está unida covalentemente a fosfatidilinositol. Los ácidos grasos de este glicerofosfolípido se insertan en la membrana lipídica, anclando así la proteína. Estas moléculas se conocen como **anclas de glucosil-fosfatidilinositol (GPI).** Más de 50 proteínas se unen a la membrana de esta forma, entre las que se encuentran enzimas, antígenos y proteínas de adhesión celular; la Tabla 12.3 es una lista parcial de las mismas. Los grupos acilo graso del fosfatidilinositol parecen ser específicos para proteínas diferentes. Hasta ahora, todas las proteínas de las que se ha descubierto que se unen mediante un ancla GPI se localizan en la cara externa de la membrana plasmática. El significado de este tipo de anclaje está aún por precisar, pero podría ser importante para la localización de la proteína en la membrana, el control de la función de la proteína y su liberación controlada de la membrana. Una **fosfolipasa C** específica de fosfatidilinositol cataliza la hidrólisis del enlace fosfato–inositol, lo que provoca la liberación de la proteína.

Los ácidos mirístico y palmítico también pueden unirse covalentemente a proteínas y sirven para anclar proteínas en membranas mediante la inserción de la cadena de acilo en la bicapa lipídica (Figura 12.23*f*). El ácido mirístico (C_{14}) se une mediante un enlace amida a una glicina aminoterminal, mientras que el ácido palmítico (C_{16}) se une más frecuentemente por un enlace tioéster a una cisteína o por un enlace hidroxiéster a una serina o treonina.

Aunque los modelos de membrana parecen sugerir que algunas proteínas se distribuyen al azar por toda la membrana, existe un elevado nivel de organización funcional con restricciones definidas en la localización de algunas proteínas. Por ejemplo, las proteínas que participan en el transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna funcionan coordinadamente y se organizan tanto lateral como transversalmente en la membrana para formar una unidad funcional. La localización de proteínas específicas en la superficie de las membranas plasmáticas también está controlada. Las células que tapizan la luz de las nefronas del riñón tienen enzimas específicos de la membrana plasmática en la superficie luminal de la célula, aunque no en la contraluminal; los enzimas restringidos a una región concreta de la membrana se localizan allí para hacer posibles las funciones específicas de esas

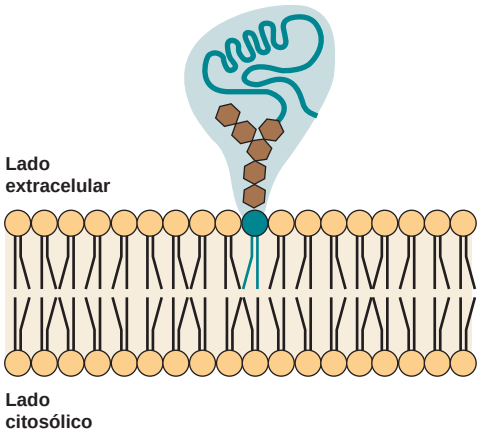


FIGURA 12.24
Unión de una proteína a una membrana mediante un ancla de glucosil-fosfatidilinositol.

TABLA 12.3 Proteínas con una ancla de glucosil-fosfatidilinositol

Fosfatasa alcalina
5'-Nucleotidasa
Acetilcolinesterasa
Trehalasa
Dipeptidasa renal
Lipoproteína lipasa
Antígeno carcinoembrionario
Molécula de adhesión celular neural
Proteína priónica del scrapie
Proteína de los oligodendrocitos y la mielina

Tomado de Low, M.G. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J.* 3:1600, 1989.

células. Existe, pues, un alto grado de organización molecular de las membranas biológicas que no es fácil apreciar en los dibujos esquemáticos.

Los eritrocitos humanos son ideales para el estudio de la estructura de las membranas

La estructura de la membrana plasmática del eritrocito humano ha sido muy investigada, debido a la facilidad con que puede purificarse del resto de los componentes celulares. En la Figura 12.25 se representa la interacción de algunas de las muchas proteínas de esta membrana.

Los lípidos se distribuyen de forma asimétrica en las membranas

La distribución de los componentes lipídicos de una membrana biológica es asimétrica. Cada capa de la bicapa tiene una composición en glicerofosfolípidos y esfingolípidos individuales diferente. La distribución asimétrica de los lípidos en la membrana del eritrocito humano se muestra en la Figura 12.26. La esfingomielina se encuentra predominantemente en la capa exterior, mientras que la fosfatidiletanolamina predomina en la capa lipídica interna. En cambio, el colesterol se distribuye por igual a ambos lados de la membrana.

El movimiento transversal de un lado a otro no catalizado (es decir, el movimiento flip-flop) de los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos es lento. La asimetría de lípidos se mantiene mediante proteínas de membrana específicas, llamadas **transportadores de lípidos**, que promueven el movimiento transversal de lípidos

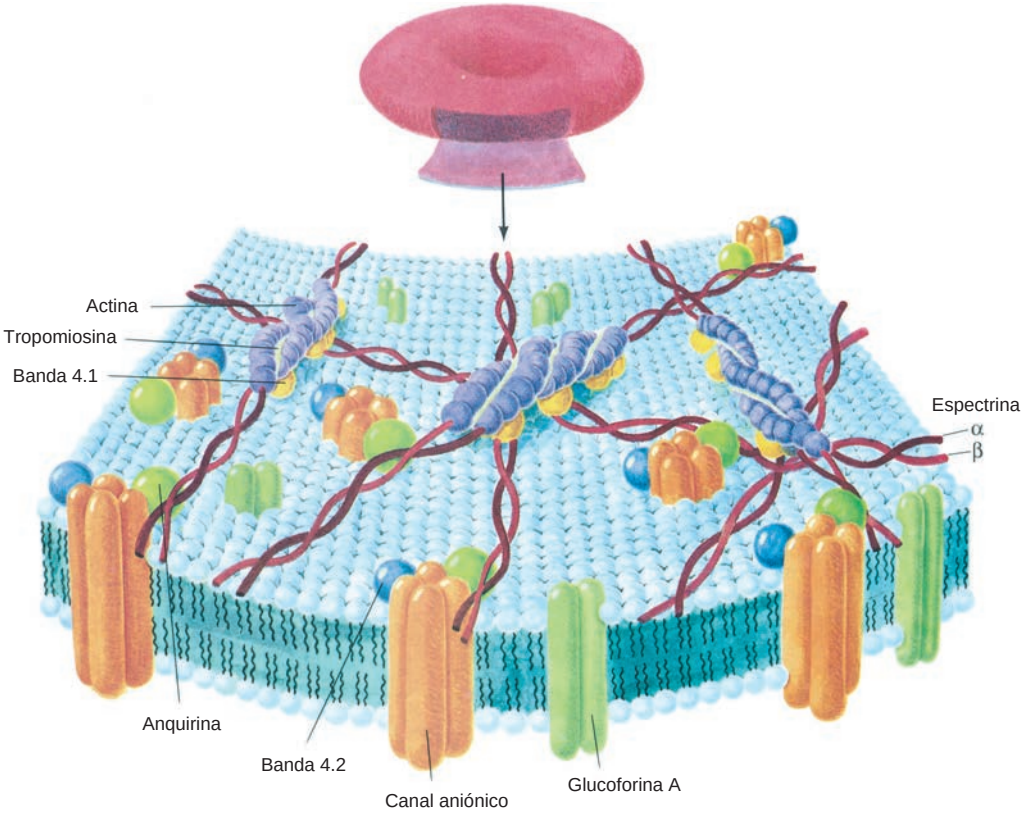


FIGURA 12.25
Diagrama esquemático de la membrana de los eritrocitos.
El diagrama muestra la relación de cuatro proteínas asociadas a la membrana con la bicapa lipídica. La glucoforina es una glucoproteína de 131 aminoácidos y de función desconocida. La banda 3, así denominada por su movilidad electroforética, contiene alrededor de 900 aminoácidos, interacciona con la anquirina y posiblemente esté relacionada con la difusión facilitada del Cl^- y HCO_3^-. La anquirina y la espectrina son proteínas periféricas de membrana, y forman parte del citoesqueleto. La anquirina se une a la banda 3 y la espectrina está anclada en la membrana a través de la anquirina.
Tomado de D. Voet y J. Voet, Biochemistry, *2nd ed. New York: Wiley, 1995. Reproducido con permiso de John Wiley & Sons, Inc.*

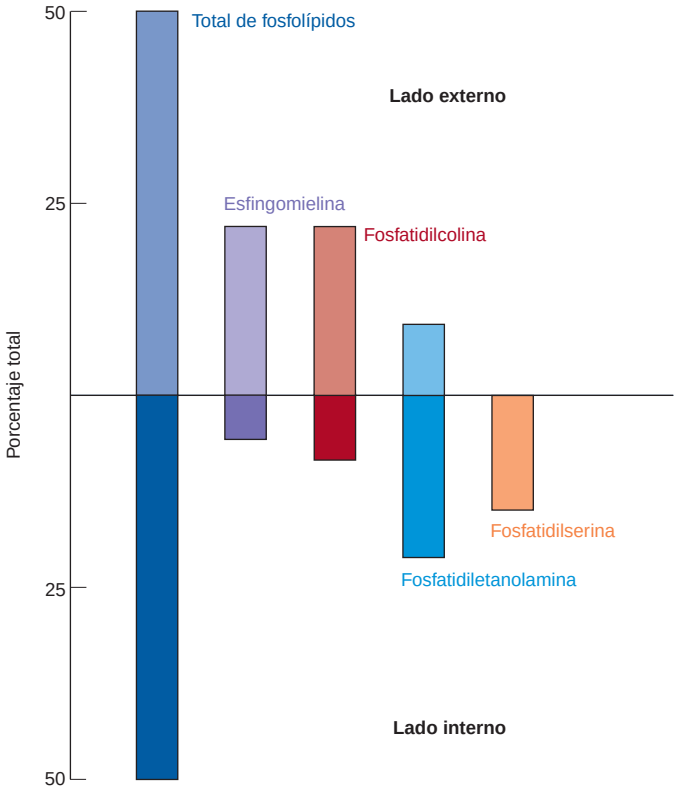


FIGURA 12.26
Distribución de fosfolípidos entre las capas interna y externa de la membrana eritrocitaria humana.
Los valores indican el porcentaje de cada fosfolípido en la membrana. *Adaptado de A. J. Verkeij, R. F. A. Zwall, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn y L. L. M. Van Deenan. The asymetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. Biochim. Biophys. Acta 323:178, 1973.*

específicos de una capa a la otra. Se han identificado tres proteínas para el movimiento de fosfolípidos entre capas de la membrana. Un transportador dependiente de ATP específico para fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina cataliza el transporte hacia el interior de los aminoglicerolípidos. La proteína, a la que se le ha dado el nombre oficioso de **"flipasa"**, mantiene la baja concentración de estos fosfolípidos en la capa externa de la membrana plasmática. Un transportador hacia el exterior, denominado **"flopasa"** carece de especificidad para los fosfolípidos y puede ser dependiente de energía. La flopasa podría ser la glucoproteína P presente en las membranas plasmáticas responsable de la resistencia multifármaco de algunas células cancerosas (véase p. 858). Un tercer transportador de lípidos, denominado **"escramblasa"** (del inglés "scramble" revolver), mezcla los fosfolípidos entre las dos capas; no presenta especificidad con respecto a los fosfolípidos y su actividad está estimulada por el aumento del Ca^{2+} intracelular. La escramblasa parece tener un papel importante en la cascada de coagulación dependiente de células (véase p. 1031) y en el reconocimiento de células dañadas para su eliminación por el sistema reticuloendotelial. En ambas respuestas se ha propuesto que es el movimiento de fosfatidilserina hacia la capa exterior el que inicia la respuesta. Estos transportadores lipídicos pueden controlar la distribución asimétrica de los fosfolípidos.

Las proteínas y los lípidos difunden en las membranas

Las interacciones entre los diferentes lípidos y entre lípidos y proteínas son muy complejas y dinámicas. Existe una fluidez en la porción lipídica de la membrana en la que se mueven tanto los lípidos como las proteínas. El grado de fluidez depende de la temperatura y de la composición de la membrana. A bajas temperaturas los lípidos se encuentran en un estado de gel cristalino, donde su movilidad está restringida. Al aumentar la temperatura se produce una transición de fase hacia el estado de líquido cristalino, en el que la fluidez es mayor (Figura 12.27). En los liposomas preparados a partir de un único tipo de fosfolípido, la temperatura de cambio de fase, T_m, es bastante precisa; por el contrario, en liposomas constituidos por una mezcla de lípidos, la T_m es menos precisa, porque ciertas agrupaciones individuales de lípidos pueden encontrarse tanto en estado de gel cristalino como de líquido cristalino. Debido a la composición química heterogénea de las membranas biológicas, su T_m no es precisa.

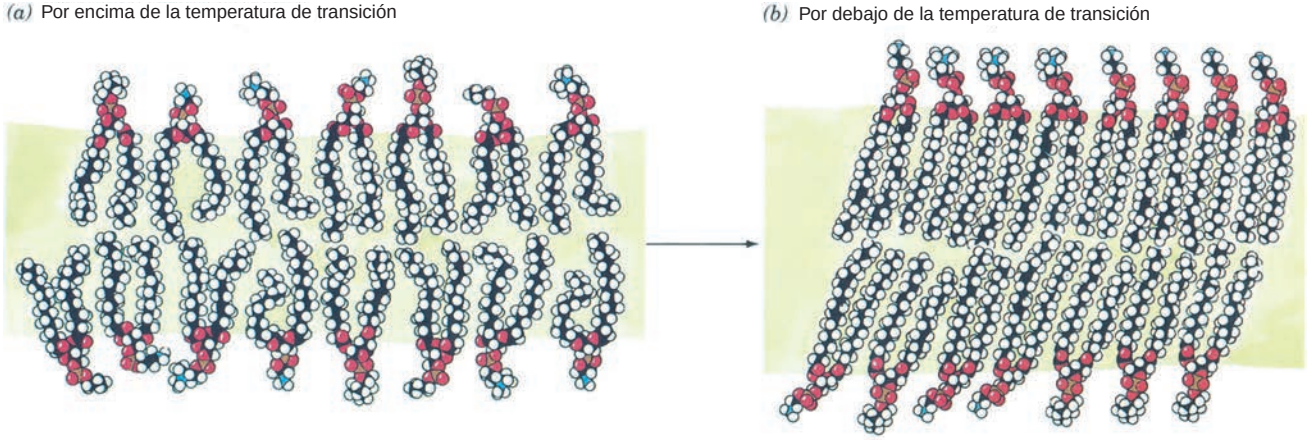
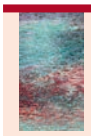


FIGURA 12.27
Estructura de la bicapa lipídica por encima y por debajo de la temperatura de transición.
Figura tomada de D. Voet y J. Voet, Biochemistry, *2nd ed. New York: Wiley, 1995. Reproducido con permiso de John Wiley & Sons, Inc.*

Interacciones entre lípidos y proteínas provocan alteraciones en los estados de líquido y de gel por toda la membrana, apareciendo así áreas de diferente fluidez.

La composición específica de las membranas biológicas individuales provoca diferencias de fluidez. La presencia de glicerofosfolípidos con ácidos grasos de cadena corta, así como el aumento de la insaturación en los grupos acilo grasos, incrementan la fluidez. Los dobles enlaces en *cis* de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos producen una curvatura en la cadena hidrocarbonada que impide el empaquetamiento compacto de las cadenas y crea bolsas en las áreas hidrofóbicas. Se considera que estos espacios, que son móviles a causa del movimiento de las cadenas hidrocarbonadas, están ocupados por moléculas de agua y pequeños iones. El colesterol, con su estructura anular plana y rígida, reduce el enrollamiento de la cadena de ácido graso y disminuye la fluidez. Se considera que un nivel elevado de colesterol sanguíneo tiene una importancia clínica en la fluidez de la membranas celulares (véase Apli. Clín. 12.2). El Ca^{2+} disminuye la fluidez de las membranas, debido a su interacción con los fosfolípidos cargados negativamente, lo que reduce la repulsión entre los grupos polares e incrementa el empaquetamiento de las moléculas lipídicas. El Ca^{2+} provoca la formación de agregados de lípidos que reducen la fluidez de la membrana.



APLICACIÓN CLÍNICA 12.2
Anormalidades en la fluidez de las membranas celulares en estados patológicos

La fluidez de la membrana puede controlar la actividad de enzimas ligados a ella, y la de funciones como la fagocitosis y el crecimiento celular. Un factor importante en el control de la fluidez de la membrana plasmática en organismos superiores y mamíferos es la presencia de colesterol. Al aumentar el contenido de colesterol, las bicapas lipídicas se hacen menos fluidas en su superficie exterior, pero más fluidas en el interior hidrofóbico. Las membranas eritrocitarias de los individuos con anemia por acantositosis tienen un contenido de colesterol elevado y una forma espinosa al tiempo que las células se destruyen de manera prematura en el bazo. Esto se da, por ejemplo, en una enfermedad hepática grave como la cirrosis del hígado en los alcohólicos. El contenido de colesterol se halla incrementado en un 25 a 65%, y la fluidez de la membrana disminuida. La membrana eritrocitaria requiere un grado elevado de fluidez para su funcionamiento, y cualquier descenso puede tener efectos graves en la capacidad de las células de pasar por los capilares. En otras células, el incremento de colesterol en la membrana plasmática conduce a un incremento en el colesterol de las membranas intracelulares, lo cual también afecta a su fluidez. El efecto tóxico del etanol sobre el sistema nervioso se debe probablemente a la modificación de la fluidez de la membrana y a la alteración de los receptores y canales iónicos de la misma. Los individuos con abetalipoproteinemia presentan un incremento en el contenido de esfingomielina y una disminución de fosfatidilcolina en las membranas celulares, lo que provoca una disminución de la fluidez. Las ramificaciones de estos cambios en la fluidez no se conocen aún, pero se espera que, a medida que mejoren las técnicas para la medida y la evaluación de la fluidez de la membrana celular, algunas de las manifestaciones patológicas en estados de enfermedad puedan explicarse sobre la base de cambios en la estructura y función de las membranas.

Cooper, R. A. Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N. Engl. J. Med.* 297:371, 1977.

También varía la fluidez a distintos niveles dentro de la membrana. Las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se mueven produciendo una fluidez dentro del núcleo hidrofóbico. El área central de la bicapa ocupada por los extremos de las cadenas hidrocarbonadas es más fluida que las áreas próximas a las dos superficies, en donde hay más impedimentos debido a las porciones más rígidas de las cadenas hidrocarbonadas. El colesterol hace que la membrana sea más rígida hacia la periferia, ya que no alcanza el núcleo central de la membrana.

Los lípidos y proteínas individuales pueden desplazarse rápidamente en un movimiento lateral por todo lo ancho de la superficie de la membrana. Sin embargo, las interacciones electrostáticas con las cabezas polares, las interacciones hidrofóbicas del colesterol con determinados fosfolípidos y glucolípidos y las interacciones lípido–proteína, restringen este movimiento. Existen dominios en los que los lípidos se mueven de manera conjunta. Los glicerofosfolípidos (G) y el colesterol (C) se agrupan conjuntamente en microdominios concretos, las **balsas lipídicas G,C** (G,C-lipid rafts) y se mueven como una unidad. En algunas células estas balsas G,C junto con proteínas específicas ancladas con glucosilfosfatidilinositol (véase p. 507) están implicadas en la formación de **cavidades**, invaginaciones en forma de frasco de la membrana plasmática. Estas estructuras intervienen en la señalización celular y podrían ser responsables de la separación hacia polos distintos de proteínas específicas en las células epiteliales.

Las proteínas integrales de membrana se mueven en el entorno lipídico, tal como se demostró al fusionar células humanas y de rata. Cuando se marcaron las proteínas antigénicas de membrana de ambas especies con diferentes anticuerpos, los marcadores indicaron la localización de las proteínas sobre la membrana. Inmediatamente después de la fusión de las células, las proteínas de la membrana de la célula humana y las de rata estaban segregadas en diferentes semiesferas de la nueva célula, pero al cabo de 40 minutos los dos grupos de proteínas se habían distribuido uniformemente sobre la nueva membrana celular. Estos movimientos pueden ser sólo válidos para algunas proteínas ya que en la mayoría de las células los movimientos de las proteínas están restringidos por otras proteínas de la membrana o de la matriz, así como por elementos estructurales celulares tales como microtúbulos o microfilamentos a los que puedan estar adheridas.

Existen pruebas de que la fluidez de las membranas celulares puede cambiar en respuesta a cambios en la dieta o en el estado fisiológico. Su contenido en ácidos grasos y colesterol es modificable por diversos factores. Asimismo, ciertos agentes farmacológicos pueden tener un efecto directo sobre la fluidez de la membrana. Los **anestésicos**, que inducen sueño y relajación muscular, podrían deber su acción al efecto sobre la fluidez de la membrana de células específicas. Compuestos sin relación estructural y que inducen anestesia tienen como característica en común su solubilidad en los lípidos. *In vitro*, los anestésicos aumentan la fluidez de la membrana.

De este modo, las membranas celulares se encuentran en un estado constantemente cambiante, no sólo mediante movimientos laterales de proteínas y lípidos sobre la membrana, sino también a causa de las moléculas que entran y salen de la membrana. La membrana crea una variedad de microambientes, que van desde la porción hidrofóbica del núcleo interior de la membrana a la interfase con los entornos circundantes. Es difícil expresar con palabras o dibujos el estado altamente fluido y dinámico, ya que ni las primeras ni los segundos captan los cambios dependientes del tiempo que tienen lugar en las membranas biológicas. La Figura 12.28 intenta ilustrar los aspectos estructurales y de movimiento de las membranas celulares.

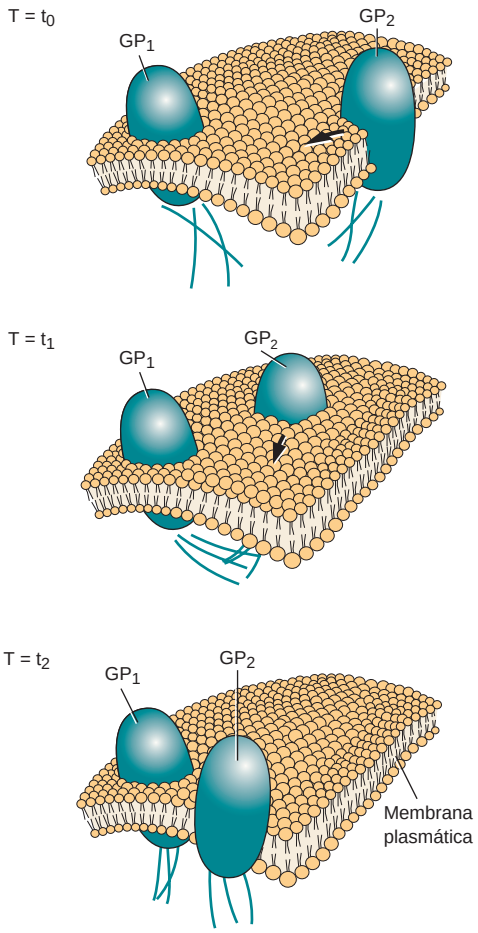


FIGURA 12.28
Versión modificada del modelo del mosaico fluido de las membranas biológicas para indicar la movilidad de las proteínas de la membrana.
t_0, t_1 y t_2 representan diferentes momentos en el tiempo. Algunas proteínas integrales (GP_2) pueden difundir lateralmente con libertad en el plano de la membrana dirigidas por los componentes citoesqueléticos, mientras que otras (GP_1) pueden estar restringidas en su movilidad.

12.5 MOVIMIENTO DE LAS MOLÉCULAS A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS

La naturaleza lipídica de las membranas biológicas restringe severamente el tipo de moléculas que pueden difundir rápidamente de un lado a otro. Los iones inorgánicos y las moléculas orgánicas cargadas no difunden a velocidad apreciable, debido a la atracción de estas moléculas hacia las moléculas de agua y a la exclusión de las especies cargadas por el ambiente hidrofóbico de la membrana lipídica. El tamaño de las moléculas grandes tales como las proteínas y los ácidos nucleicos impide que su difusión sea significativa. La velocidad de difusión de la mayoría de los nutrientes e iones inorgánicos es demasiado lenta para satisfacer las necesidades de la célula. Para

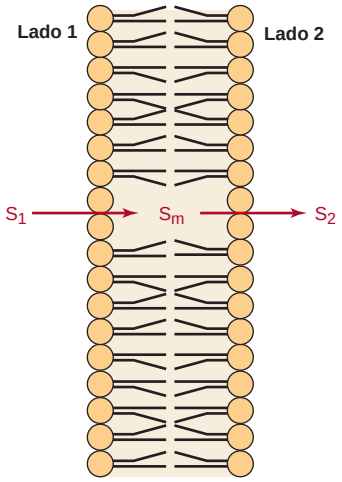


FIGURA 12.29
Difusión de una molécula de soluto a través de una membrana.
S_1 y S_2 son el soluto a cada lado de la membrana, y S_m es el soluto dentro de la membrana.

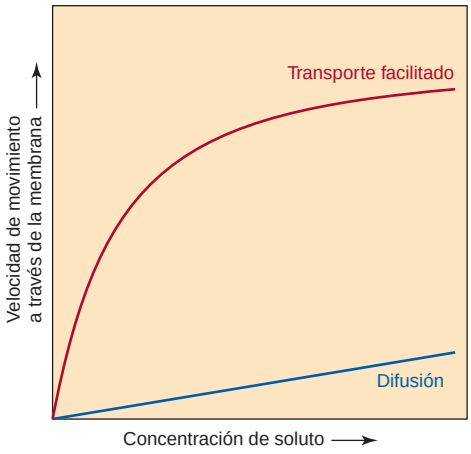


FIGURA 12.30
Cinética del movimiento de una molécula de soluto a través de una membrana.
La velocidad inicial de difusión es directamente proporcional a la concentración del soluto. En el transporte facilitado, la velocidad alcanza una $V_{máx}$ cuando el transportador está saturado.

superar esta situación, la translocación de agua, nutrientes e incluso productos de desecho a través de las membranas implica una gran variedad de transportadores y de canales especializados. Se han identificado varios centenares de transportadores, muchos de ellos gracias a la utilización de la tecnología recombinante.

En las siguientes secciones se presentan los mecanismos básicos mediante los cuales las moléculas atraviesan las membranas celulares y se dan ejemplos de los procesos. En capítulos posteriores se discute el papel de algunos transportadores en la homeostasis celular. Muchas enfermedades genéticas se deben a cambios en mecanismos de transporte.

Algunas moléculas difunden a través de las membranas

La **difusión** de una sustancia a través de una membrana implica tres pasos principales: (1) el soluto debe abandonar el ambiente acuoso en un lado y entrar en la membrana; (2) el soluto debe atravesar la membrana; y (3) el soluto debe abandonar la membrana para entrar en un nuevo ambiente en el lado opuesto (Figura 12.29). Cada paso supone un equilibrio del soluto entre dos estados. Las limitaciones termodinámicas y cinéticas controlan el equilibrio final establecido para las concentraciones de la sustancia a ambos lados de la membrana y la velocidad a la que puede alcanzar este equilibrio. La difusión de gases tales como el O_2, N_2, CO_2 y NO se produce rápidamente y depende exclusivamente del gradiente de concentración. El agua difunde a través de las membranas biológicas bajo fuerzas osmóticas, probablemente a través de los huecos creados en el entorno hidrofóbico por el movimiento al azar de las cadenas acílicas grasas de los lípidos. Para la difusión de un soluto con fuerte interacción con moléculas de agua, el soluto debe desprenderse de la cubierta acuosa para entrar en el medio lipídico, pero debe recuperarla al salir de la membrana. La distribución de sustancias hidrofóbicas entre la fase acuosa y la membrana lipídica dependerá del grado de liposolubilidad de la sustancia; los materiales muy liposolubles se disolverán fácilmente en la membrana.

La velocidad de difusión de una sustancia lipofílica es directamente proporcional a su liposolubilidad y a su coeficiente de difusión en lípidos; este último es una función del tamaño y forma de la sustancia.

La dirección del movimiento de solutos por difusión se produce siempre desde una concentración más elevada a una más baja, y su velocidad se describe por la **primera ley de la difusión de Fick**:

$$J = -D\left(\frac{\delta c}{\delta x}\right)$$

en donde J es la cantidad neta de sustancia movida por unidad de tiempo, D es el coeficiente de difusión y $\delta c/\delta x$ es el gradiente químico de la sustancia. A medida que la concentración de soluto en un lado aumenta, mayor será la *velocidad inicial* de difusión, tal como se ilustra en la Figura 12.30. Continuará habiendo un movimiento neto de moléculas desde un lado al otro hasta que la concentración en ambos esté en equilibrio químico. Una vez alcanzado el equilibrio, existirá un intercambio continuado de moléculas de soluto entre uno y otro lado, pero no podrá haber acumulación neta en un lado, ya que de ser así se volvería a crear un gradiente de concentración.

Se puede facilitar el movimiento de moléculas a través de las membranas

Las membranas tienen mecanismos de translocación con un elevado grado de especificidad para diversas sustancias. En ellos intervienen proteínas intrínsecas de membrana y se clasifican según el mecanismo de translocación del sustrato y la energética del sistema. En la Tabla 12.4 se muestra una clasificación de los **sistemas de transporte**. Cada uno de ellos se expondrá con más detalle en las secciones siguientes, pero ahora es importante diferenciar tres tipos principales.

Canales de membrana

Las membranas de la mayoría de las células contienen **canales** específicos, en algunos casos conocidos como **poros**, que permiten el movimiento rápido de moléculas o iones específicos de un lado a otro de la membrana. Las estructuras terciaria y

TABLA 12.4 Clasificación de los sistemas de transporte de membrana

Tipo	*Clase*	*Ejemplo*
Canal	1. Regulado por voltaje	Canal de Na^+
	2. Regulado por agonista	Receptor de acetilcolina
	3. Regulado por cAMP	Canal de Cl^-
	4. Otros	Sensible a presión, extensión, calor
Transportador	1. Facilitado pasivo	Transportador de glucosa
	2. Facilitado activo	
	a. Primario acoplado a redox	Unido a la cadena respiratoria
	Primario-ATPasa	Na^+, K^+–ATPasa
	Caset fijadora de ATP	Transportador de proteína de resistencia multifármaco
	b. Secundario	Transportador de glucosa dependiente de Na^+
Translocación de grupo		Translocación de aminoácidos

cuaternaria de estas proteínas intrínsecas de membrana crean un orificio acuoso que permite la difusión de sustancias en ambos sentidos a través de la membrana. Las sustancias sólo se desplazan en la dirección de menor concentración y mientras el canal está abierto pasan muchas moléculas de un lado al otro de la membrana. Las proteínas de los canales no se unen a las moléculas o iones que se transportan, pero pueden ser inhibidas. No obstante, los canales tienen una cierta especificidad respecto al tamaño y carga de la sustancia. El flujo a través de los canales se regula por diversos mecanismos que abren y cierran el orificio (Tabla 12.4).

Transportadores

Para translocar una molécula o ion a través de la membrana, los **transportadores** se unen a ellos y los mueven físicamente. La actividad puede medirse con los mismos parámetros cinéticos que una reacción catalizada enzimáticamente a excepción de que no tiene lugar ninguna reacción química. Los transportadores tienen especificidad para la sustancia que ha de transportar, (llamada sustrato); presentan una cinética de reacción definida; y pueden ser inhibidos por inhibidores competitivos y no competitivos. Algunos transportadores sólo mueven las moléculas a favor de su gradiente de concentración (se conoce como transporte pasivo o difusión facilitada), mientras que otros lo hacen en contra de dicho gradiente (transporte activo), por lo que necesitan el gasto de algún tipo de energía. Tanto en el caso de los canales como en el de los transportadores, la molécula no cambia durante la translocación a través de la membrana.

Una diferencia importante entre los canales y los transportadores es la velocidad de translocación del sustrato; para un canal, velocidades del orden de 10^7 iones s^{-1} son habituales, mientras que para un transportador, la velocidad es del orden de 10^2–10^3 moléculas s^{-1}. Se puede modular la actividad de todos los sistemas de translocación, lo que permite a las células y tejidos controlar el movimiento de sustancias a través de las membranas. Se han desarrollado fármacos dirigidos a canales y transportadores específicos para controlar dichos procesos.

Translocación de grupo

La **translocación de grupo** no sólo implica el movimiento de una sustancia a través de la membrana, sino también la modificación química durante el proceso. Un mecanismo de captación de azúcares por parte de las bacterias implica el transporte y posterior fosforilación del azúcar antes de liberarse en el citosol. En la captación de aminoácidos por parte de algunos tejidos de mamífero está implicado un mecanismo de translocación de grupo.

Los sistemas de transporte de membrana presentan características comunes

Las proteínas o complejos proteicos implicados en sistemas de transporte se han designado con una variedad de nombres, entre los que se cuentan **transportador**, **translocasa**, **translocador**, **permeasa** y **bomba** o también **sistema transportador**, **meca-**

TABLA 12.5 Características de los transportadores de membrana

Facilitado pasivo	*Facilitado activo*
1. Cinética de saturación	1. Cinética de saturación
2. Especificidad por el soluto transportado	2. Especificidad por el soluto transportado
3. Puede ser inhibido	3. Puede ser inhibido
4. El soluto se mueve a favor de un gradiente de concentración	4. El soluto puede moverse en contra de un gradiente de concentración
5. No se produce gasto de energía	5. Requiere un aporte acoplado de energía

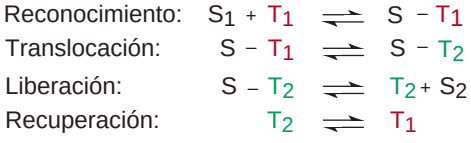


FIGURA 12.31
Reacciones implicadas en el transporte facilitado a través de las membranas biológicas.
S_1 y S_2 son los solutos en los lados 1 y 2 de la membrana respectivamente; T_1 y T_2 son los sitios de unión del transportador en los lados 1 y 2 respectivamente.

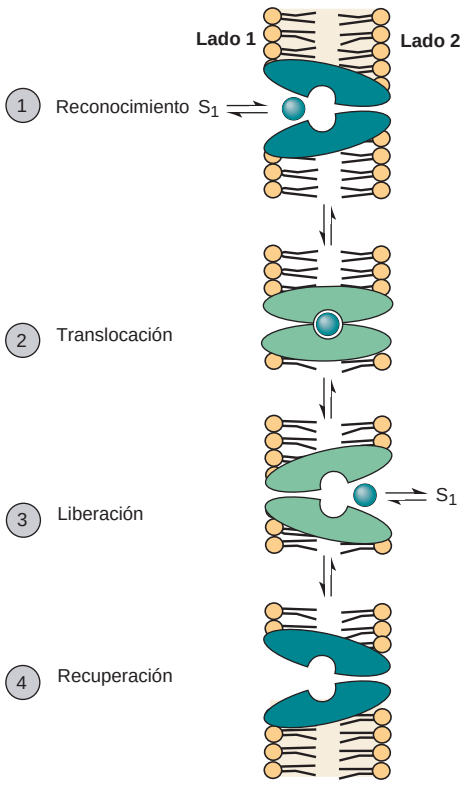


FIGURA 12.32
Modelo de un sistema de transporte facilitado a través de una membrana biológica.
Este modelo se basa en el concepto de centro específico para la unión de sustrato y en un cambio conformacional en el transportador para desplazar el soluto unido una distancia corta, pero hacia el entorno del otro lado de la membrana. Una vez allí, el soluto se libera del transportador.

nismo de translocación y **sistema de transporte facilitado**. Estas designaciones se utilizan indiscriminadamente, pero por conveniencia utilizaremos transportador al referirnos a las proteínas implicadas en la translocación. Los transportadores tienen una serie de características comunes. Facilitan el movimiento de una molécula o moléculas a través de la bicapa lipídica a una velocidad significativamente superior a la que se produciría por simple difusión. Si S_1 es el soluto en el lado 1 y S_2 en el lado 2, el transportador promueve el establecimiento de un equilibrio tal como sigue

$$[S_1] \rightleftharpoons [S_2]$$

Aquí los corchetes representan la concentración del soluto. Si en el equilibrio se incluye el transportador (T), la reacción es

$$[S_1] + T \rightleftharpoons [S - T] \rightleftharpoons [S_2] + T$$

Si no hay suministro de energía al sistema, la concentración a ambos lados de la membrana será igual en el equilibrio, pero si hay gasto de energía, puede establecerse un gradiente de concentración. Nótese la semejanza del papel del transportador con el de un enzima; en ambos casos la proteína incrementa la velocidad pero no determina el equilibrio final.

En la Tabla 12.5 se enumeran las principales características de los sistemas transportadores de membrana. Tal como se presenta en la Figura 12.30, los transportadores muestran **cinética de saturación**; a medida que aumenta la concentración de la sustancia que ha de ser translocada, la velocidad inicial de transporte aumenta, alcanzando su máximo cuando la sustancia satura la proteína transportadora de la membrana. La difusión simple no muestra cinética de saturación. Pueden calcularse constantes tales como $V_{máx}$ y K_m para los transportadores. Al igual que los enzimas, los transportadores pueden catalizar el movimiento de un soluto en ambas direcciones a través de la membrana, dependiendo de la $\Delta G'$ de la reacción.

La mayor parte de los transportadores tienen un grado elevado de especificidad estructural y de estereoespecificidad con respecto a la sustancia transportada. Un ejemplo de ello es el sistema de transporte facilitado de la D-glucosa en los eritrocitos, en donde la K_m para la D-galactosa y para la L-glucosa son, respectivamente, 10 y 1000 veces mayores que para la D-glucosa. El transportador no tiene, prácticamente, actividad con la D-fructosa o con disacáridos. Los análogos estructurales del sustrato inhiben competitivamente, y los reactivos que reaccionan con grupos específicos de las proteínas son inhibidores no competitivos.

En el transporte de moléculas de soluto existen cuatro pasos comunes

Tenemos que ampliar la ecuación anterior y considerar cuatro aspectos del transporte facilitado (Figura 12.31). Estos son: (1) reconocimiento por el transportador del soluto adecuado de entre una multitud de solutos presentes en el ambiente acuoso; (2) translocación del soluto a través de la membrana; (3) liberación del soluto por el transportador; y (4) recuperación del transportador en su condición original para poder así aceptar otra molécula de soluto.

El primer paso, **reconocimiento** de un sustrato específico por el transportador, puede explicarse sobre la misma base que la descrita para el reconocimiento de un sustrato por un enzima (véase p. 441). La presencia de centros de fijación específicos en la proteína permite reconocer la estructura correcta del soluto que ha de ser translocado. El segundo paso, la **translocación**, tiene lugar cuando el sustrato unido induce un cambio conformacional en la proteína (Figura 12.32). Esto mueve

el sustrato una corta distancia, quizás de sólo 2 ó 3 Å, en el ambiente del lado opuesto de la membrana. De este modo, no es necesario que el transportador mueva la molécula a través de toda la membrana. El paso 3, la **liberación** del sustrato tiene lugar si la concentración del sustrato es menor en el nuevo ambiente que en el lado inicial de la fijación. Sin un cambio en la afinidad (K_{eq}) de la proteína por el sustrato existiría un desplazamiento en el equilibrio con la liberación de una parte del sustrato. En el caso de los transportadores que transportan un soluto contra un gradiente de concentración, la liberación del soluto en el compartimiento de concentración más elevada requiere una disminución de la afinidad del soluto por el transportador. Un cambio en la conformación del transportador puede hacer descender la afinidad. En la translocación de grupo (p. 819), el soluto se modifica químicamente mientras está unido al transportador y la molécula modificada tiene una afinidad menor por el transportador. Finalmente, en la **recuperación**, paso 4, el transportador retorna a la conformación original después de liberar el sustrato.

La exposición anterior se ha centrado en el movimiento de una sola molécula de soluto por el transportador. Se conocen sistemas que mueven simultáneamente dos moléculas en una dirección (mecanismo "symport" o de cotransporte paralelo), dos moléculas en direcciones opuestas (mecanismo "antiport" o de cotransporte antiparalelo), o bien una sola molécula en una dirección (mecanismo "uniport" o de transporte único) (Figura 12.33). Cuando una sustancia cargada, tal como K^+, es translocada y no se traslada un ion de carga opuesta, se produce una separación de carga a través de la membrana. Este mecanismo se denomina electrogénico y da lugar a un potencial de membrana. Si se mueve un contraión para equilibrar la carga, el mecanismo se denomina neutro o eléctricamente silencioso.

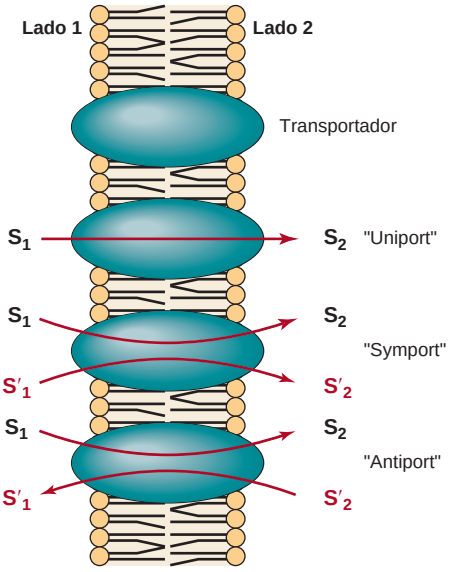


FIGURA 12.33
Mecanismos de transporte simple (uniport), cotransporte paralelo (symport) y cotransporte antiparalelo (antiport) para la translocación de sustancias.
S y S′ representan moléculas diferentes; los subíndices 1 y 2 indican moléculas S en lados diferentes de la membrana.

Energética de los sistemas de transporte de membrana

El cambio de energía libre que tiene lugar cuando una molécula no cargada se traslada desde una concentración C_1 a una concentración C_2 situada al otro lado de una membrana viene dado por la Ec. (12.1)

$$\Delta G' = 2{,}3RT \log \left(\frac{C_2}{C_1} \right) \qquad \textbf{(12.1)}$$

Cuando $\Delta G'$ es negativo, esto es, cuando se libera energía libre, el movimiento del soluto tiene lugar sin necesidad de una fuerza motriz. Cuando $\Delta G'$ es positivo, como sería el caso si C_2 fuese mayor que C_1, se necesita un suministro de energía para impulsar el transporte. En el caso de una molécula cargada (p. ej., Na^+) tanto el potencial eléctrico como las concentraciones de soluto están implicados en el cálculo del cambio de energía libre como se indica en la Ec. (12.2):

$$\Delta G' = 2{,}3RT \log \left(\frac{C_2}{C_1} \right) + Z\mathcal{F}\Psi \qquad \textbf{(12.2)}$$

en donde Z es la carga de la especie que se traslada, $\mathcal{F}$ es la constante de Faraday (23,062 kcal V^{-1} mol^{-1}) y Ψ es la diferencia de potencial eléctrico en volts a través de la membrana. El componente eléctrico es el potencial de membrana, y $\Delta G'$ es el potencial electroquímico.

Un sistema de **transporte pasivo** o **facilitado** es aquel en el que $\Delta G'$ es negativo y el movimiento del soluto tiene lugar espontáneamente. Cuando $\Delta G'$ es positivo, se requiere un suministro acoplado de energía desde alguna fuente para el movimiento del soluto y el proceso se denomina transporte activo. El **transporte activo** está impulsado por la hidrólisis del ATP a ADP o por la utilización de un gradiente electroquímico de Na^+ o H^+ a través de la membrana. En el primer caso, la energía química liberada en la hidrólisis de un enlace pirofosfato impulsa la reacción, mientras que en el segundo se disipa el gradiente electroquímico para transportar el soluto.

En varias membranas existen sistemas de transporte que pueden mantener gradientes de concentración muy grandes. Un ejemplo es el sistema de transporte de la membrana plasmática que mantiene los gradientes de Na^+ y K^+. Uno de los ejemplos más notables de sistema de transporte activo es el que está presente en las células parietales de las glándulas gástricas responsables de la secreción de HCl a la luz del estómago (véase p. 1096). El pH del plasma es de alrededor de 7,4

(4×10^{-8} M de H^+), y el pH luminal del estómago puede alcanzar 0,8 (0,15 M de H^+). Las células transportan iones H^+ contra un gradiente de concentración de $1 \times 10^{6,6}$. Suponiendo que no haya componente eléctrico, la energía para la secreción de los iones H^+ en estas condiciones se puede calcular a partir de la Ec. (12.1), y es 9,1 kcal mol^{-1} de HCl.

12.6 | CANALES Y POROS

Los canales y los poros de las membranas funcionan de forma distinta

Los canales y los poros de las membranas son proteínas intrínsecas de membrana y se diferencian por su grado de especificidad respecto a las moléculas que cruzan la membrana. Los canales son selectivos para cationes y aniones inorgánicos específicos, mientras que los poros no lo son, y permiten el paso de moléculas orgánicas e inorgánicas a través de la membrana. Por ejemplo, el **canal de Na^+** de la membrana plasmática de las células eucarióticas permite el movimiento de Na^+ a una velocidad más de diez veces superior a la de K^+. Esta diferencia entre canales y poros se debe a diferencias en el tamaño del área acuosa que aparece en la estructura de la proteína, así como a los aminoácidos que tapizan el hueco del canal. Se han identificado más de 100 familias de proteínas formadoras de canales. Un patrón común es una estructura formada por hélices α anfipáticas de subunidades proteicas asociadas o de dominios de una única cadena polipeptídica que dejan un espacio acuoso central, tal como se representa en la Figura 12.34. Una excepción a la estructura helicoidal son las porinas (véase más adelante) de las bacterias gramnegativas, que presentan una estructura en hoja β que reviste el poro central.

La apertura y el cierre de los canales están sujetos a control

La apertura y el cierre de canales de membrana implica un cambio conformacional en la proteína del canal. Los que están controlados por cambios en el **potencial transmembrana** se denominan canales regulados por el voltaje; un sensor específico detecta cambios en el potencial de membrana y transfiere su energía al canal para controlar su compuerta. En el caso del canal de Na^+, la despolarización de la membrana provoca su apertura. Existen canales regulados por el voltaje para el Na^+, el K^+ y el Ca^{2+} en las membranas plasmáticas de la mayoría de las células; la Apli. Clín. 23.1 (p. 997) describe los cambios de los canales regulados por el voltaje en los trastornos miotónicos del músculo. Las mitocondrias tienen un canal dependiente del voltaje para aniones. La unión de un agente específico, denominado **agonista**, es otro mecanismo para controlar la apertura de los canales. La unón de acetilcolina abre el canal en el **receptor nicotínico de la acetilcolina**, lo que permite la entrada de Na^+ en la célula. Esto es importante para la transmisión de la señal eléctrica entre neuronas (véase p. 998). Además, algunos canales están controlados por cAMP (véase p. 928); la Apli. Clín. 12.3 describe las modificaciones del canal de Cl^- en la fibrosis quística. Estas formas de control de la apertura de los canales son muy rápidas, lo que hace posible que se produzcan ráfagas de flujo de iones a través de la membrana a velocidades superiores a 10^7 iones s^{-1}, cercanas a su velocidad de difusión en solución. Esta velocidad es necesaria debido a que tales canales intervienen en la conducción nerviosa y en la contracción muscular. La superficie de un terminal nervioso puede contener varios centenares de moléculas diferentes que actúan como canales, entre ellos canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, canales de K^+, canales de K^+ accionados por Ca^{2+}, canales de Cl^-, canales accionados por ligando y canales activados por tensión. Cierto número de agentes farmacológicos que modulan estos canales se emplean con fines terapéuticos.

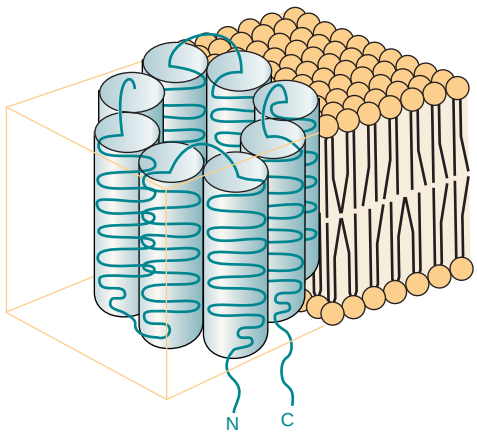


FIGURA 12.34
Ordenamiento de las subunidades o dominios proteicos para formar un canal de membrana.

Los canales de sodio y de cloruro

El **canal de sodio** sensible al voltaje es el responsable del rápido incremento de la concentración intracelular de Na^+ que sigue a la despolarización de la membrana plasmática en las células nerviosas y musculares. El canal consiste en un gran glucopolipéptido sencillo y varias glucoproteínas menores. Se han clonado los genes de algunos de los canales de Na^+ y se ha determinado su secuencia de aminoáci-

dos. Existen cuatro unidades repetidas homólogas, cada una de las cuales tiene seis hélices α transmembrana. Un modelo de este transportador se muestra en la Figura 12.35*a*. Una posible ordenación de las hélices en la membrana vista desde la parte inferior de ésta se presenta en la Figura 12.35*b*. Uno de los segmentos transmembrana, identificado como SIV, tiene un aminoácido cargado positivamente cada tres posiciones y puede actuar como sensor de voltaje. Un movimiento mecánico de esta región debido a un cambio en el potencial de membrana puede provocar un cambio conformacional en la proteína que da lugar a la apertura del canal. Sin embargo, el tamaño del canal creado por la proteína no puede explicar por completo la especificidad por el Na^+.

Los canales de cloruro participan en la regulación del volumen celular, en la estabilización del potencial de membrana, en el control de la transducción de señales y en la regulación del transporte transepitelial. Se han identificado tipos accionados por voltaje, por ligando y por caset fijadora de ATP (véase p. 525). Algunos son activados por el AMP cíclico (cAMP) y Ca^{2+}. El regulador transmembrana de la fibrosis quística es un canal de Cl^- (véase Apli. Clín. 12.3).

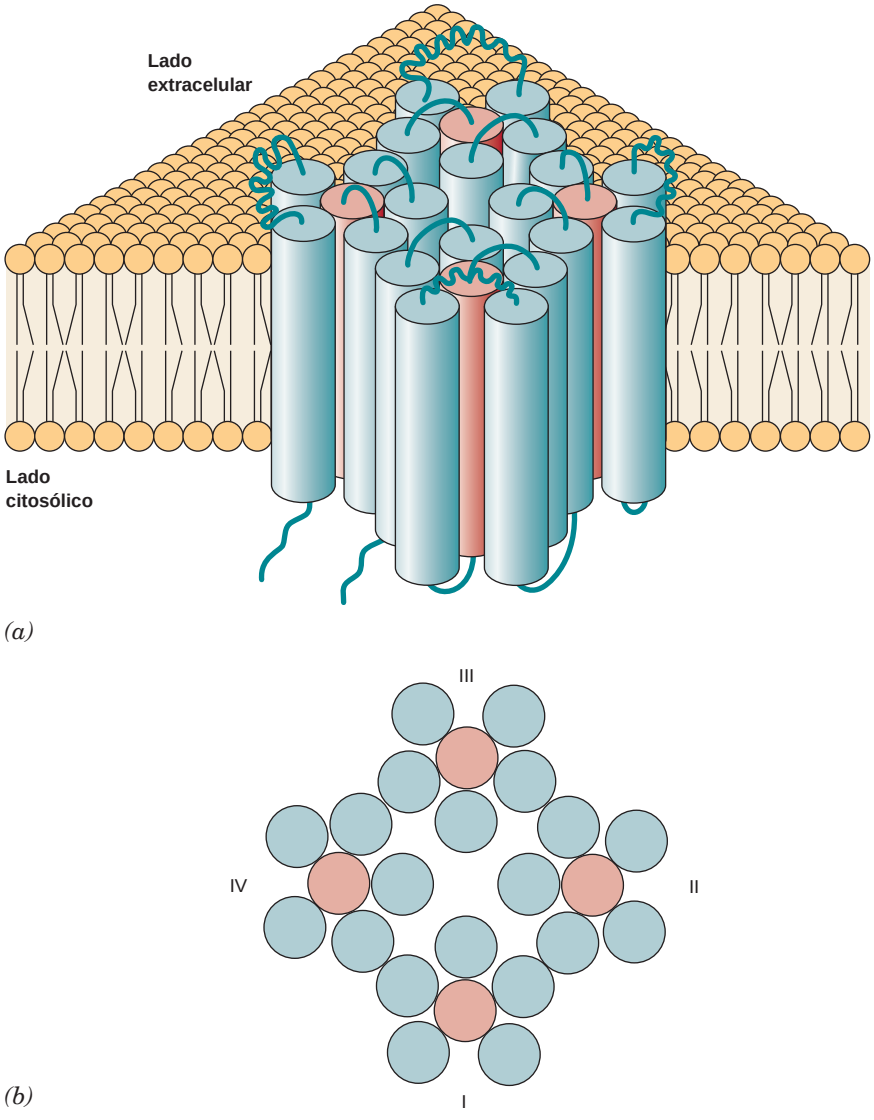
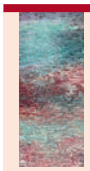


FIGURA 12.35
Un posible modelo del canal de Na^+.
(*a*) El único polipétido consta de cuatro unidades repetidas, cada una de ellas plegada en seis hélices transmembrana. (*b*) Ordenación propuesta para la secuencia transmembrana vista desde la parte inferior de la membrana.
Adaptada de M. Noda et al., Nature *(London) 320:188, 1986.*



APLICACIÓN CLÍNICA 12.3
La fibrosis quística y el canal de Cl^-

La fibrosis quística (CF), una enfermedad autosómica recesiva, es la enfermedad hereditaria más común y letal entre los caucásicos, con una frecuencia de 1 por cada 2000 nacimientos vivos. Es una enfermedad que afecta a varios órganos, pero la obstrucción pulmonar es su manifestación principal; las secreciones mucosas densas obstruyen las vías respiratorias pequeñas provocando infecciones bacterianas recurrentes. En una fase temprana, se produce además un desequilibrio de la función exocrina del páncreas que da lugar a la esteatorrea (deposiciones grasas) en los pacientes de CF; para la descripción del papel del páncreas en la digestión y absorción de las grasas, véase la p. 1104. Los pacientes de CF presentan una permeabilidad al Cl^- reducida, lo que perjudica la secreción de fluidos y electrolitos, causando una deshidratación luminal. El diagnóstico de CF se confirma por el aumento significativo del Cl^- en el sudor de los afectados en relación con los individuos normales.

El gen responsable de la CF se identificó en 1989 y ya se han encontrado más de 400 mutaciones del mismo que dan lugar a la enfermedad. La mutación más habitual (alrededor del 70%) consiste en la deleción de la fenilalanina en la posición 508 de la proteína, aunque también se han descrito mutaciones antisentido, sin sentido, de cambio de marco de lectura y de unión tras el corte y empalme (véase p. 192). Muchas mutaciones provocan un cambio en el plegamiento de la proteína. El producto del gen CF es el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que es un canal de Cl^- dependiente de cAMP y que puede, por sí mismo, regular otros canales iónicos; se expresa en tejidos epiteliales. El canal se activa por fosforilación de un dominio regulador citoplasmático por la proteína quinasa A. El CFTR está compuesto por 1480 aminoácidos y presenta homología estructural con la superfamilia de transportadores con caset fijadora de ATP (ABC). Se ha clonado el gen (véase p. 287) y se están dedicando grandes esfuerzos al tratamiento de la enfermedad mediante terapia génica, utilizando tanto vectores víricos como no víricos, incluidos los liposomas (véase Apli. Clín. 12.1).

Alton, E. W. y Geddes, D. M. Gene therapy for cystic fibrosis; a clinical perspective. *Gene Ther.* 2:88, 1995; Frizzell R. A. Functions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:54, 1995; Naren, A. P., Cormet-Boyaka, E., Fu, J., et al. CFTR chloride channel regulation by an interdomain interaction. *Science* 286:544, 1999 y Wagner, J. A., Chao, A. C. y Gardner, P. Molecular strategies for therapy of cystic fibrosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:257, 1995.

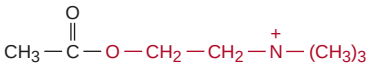


FIGURA 12.36
Estructura de la acetilcolina.

El canal nicotínico de la acetilcolina (nAChR)

El canal **nicotínico de la acetilcolina**, también conocido como **receptor de la acetilcolina**, es un ejemplo de canal regulado químicamente, ya que la unión de acetilcolina (Figura 12.36) abre el canal. El doble nombre se utiliza para diferenciar este receptor de otros receptores de acetilcolina, que funcionan de forma diferente. La acetilcolina es un neurotransmisor que es liberado en la unión neuromuscular por una neurona, al ser excitada eléctricamente. La acetilcolina difunde a la membrana del músculo esquelético donde interacciona con su receptor, lo que abre el canal y permite el movimiento selectivo de cationes a través de la membrana (véase p. 998). El cambio en el potencial transmembrana provoca una serie de procesos que culminan en la contracción muscular. El receptor nicotínico de la acetilcolina consiste en cinco subunidades polipeptídicas, dos subunidades α, una β, una γ y una δ; cada subunidad α está glucosilada, y dos de las otras tienen un lípido unido covalentemente. Se requiere la fosforilación de la subunidad α para que sea activa. El canal se abre cuando dos moléculas de acetilcolina se unen a las dos subunidades α y provocan un cambio en la conformación de la proteína; se vuelve a cerrar en milisegundos cuando se produce la hidrólisis de la acetilcolina a acetato y colina y su liberación del ligando unido. En la conformación abierta, los cationes y no electrolitos pequeños pueden fluir por el canal, pero los aniones no pueden hacerlo; los aminoácidos del canal cargados negativamente bastan para impedir el paso de iones de carga negativa.

El receptor nicotínico de la acetilcolina es inhibido por varias neurotoxinas mortales, como la ***d*-tubocurarina**, ingrediente activo del curare, y varias toxinas de serpiente, como la **α-bungarotoxina**, la **erabutoxina** y la **cobratoxina**. La **succinilcolina**, un relajador muscular, activa el canal, lo que provoca la despolarización de la membrana; la succinilcolina se emplea en cirugía porque su actividad es reversible, ya que se hidroliza rápidamente una vez que se deja de administrar.

Uniones en hendidura y poros nucleares

Las **uniones en hendidura** de la membrana plasmática y los **poros de la membrana nuclear** son aberturas relativamente grandes originadas por ciertas proteínas. Las uniones en hendidura son canales de membrana revestidos de proteínas que atraviesan dos membranas plasmáticas, creando así conexiones acuosas entre dos células. Permiten el acoplamiento eléctrico entre células y el intercambio de iones y metabolitos, pero no de compuestos de elevada masa molecular como las proteínas. El diámetro de la abertura oscila entre 12 y 20 Å. El canal está formado por

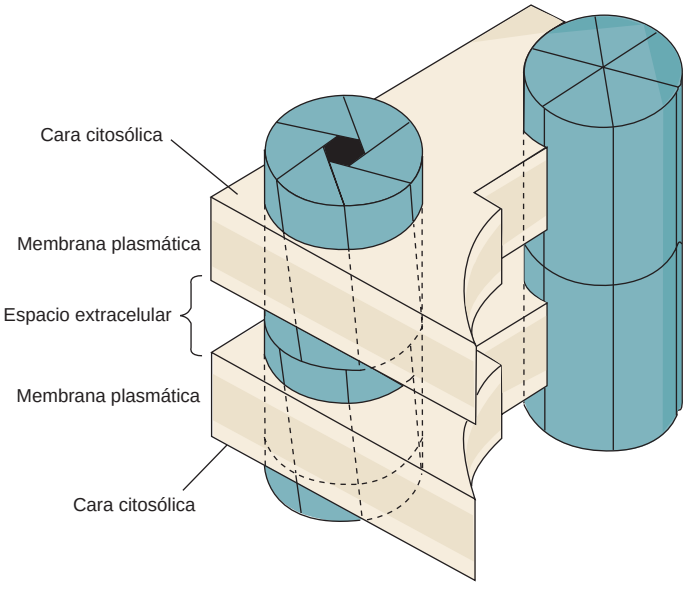


FIGURA 12.37
Modelo de un canal de una unión en hendidura.

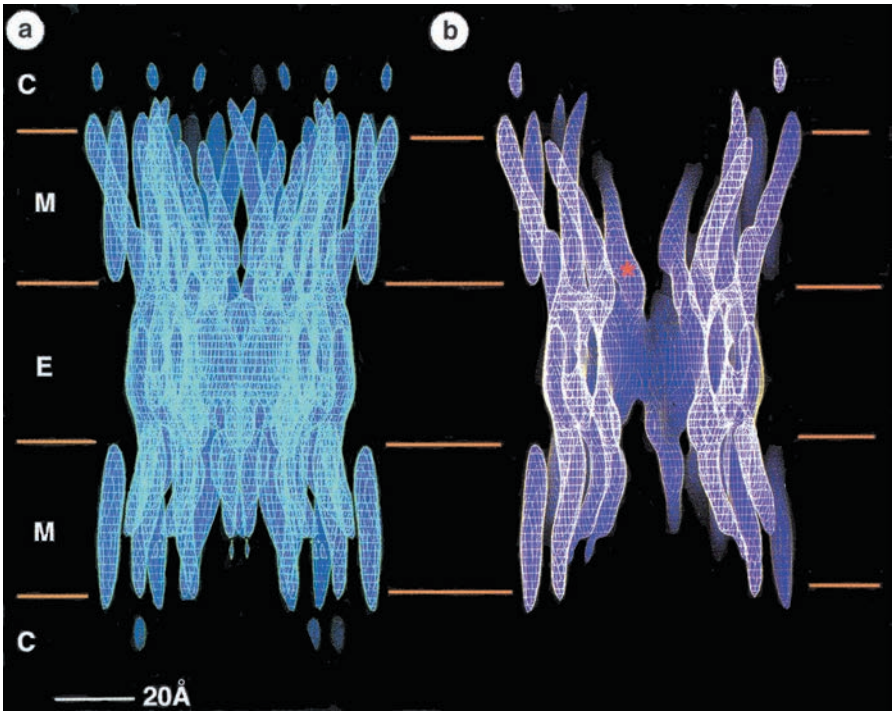


FIGURA 12.38
Organización molecular de la unión en hendidura cardíaca recombinante
Modelo desarrollado por cristalografía electrónica. *(a)* Vista completa lateral y *(b)* se ha reducido la densidad para mostrar el canal interior. M, bicapa de la membrana, E, espacio extracelular; C, espacio citoplasmático.
Reproducido con permiso de Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B. y Yeager, M. Science 283:1176, 1999. *Copyright© 1999 de American Association for the Advancement of Science.*

oligómeros del polipéptido de la unión en hendidura (32 kDa), conocido como **conexina**. Doce subunidades, seis por cada célula, forman una estructura hexamérica en cada membrana, tal como se representa en la Figura 12.37. La organización molecular de una unión en hendidura recombinante se muestra en la Figura 12.38. Aunque los canales están normalmente abiertos, un incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+}, un cambio metabólico, una caída del potencial transmembrana o la acidificación del citosol provocan su cierre. Cuando el canal está abierto, las subunidades parecen estar algo inclinadas, pero cuando se cierra parecen estar más o menos paralelas y se colocan aproximadamente perpendiculares a la membrana, lo que sugiere que las subunidades se deslizan una sobre otra.

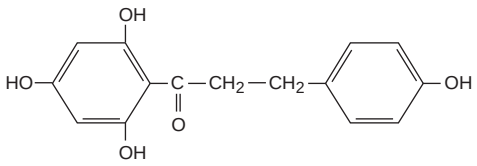
Al igual que las uniones en hendidura, los poros nucleares atraviesan dos membranas y crean canales acuosos en la membrana nuclear. El poro tiene un diámetro de unos 90 Å, lo que permite el paso de grandes macromoléculas. Son estructuras muy complejas y participan en el desplazamiento del RNA desde el núcleo al citosol. La membrana plasmática de las bacterias gramnegativas contiene poros proteicos, llamados **porinas**. Se han aislado más de 40 porinas diferentes, y su tamaño va de 28 a 48 kDa. A diferencia de la mayoría de los canales de mamíferos, los segmentos transmembrana de las mismas son hojas β y no hélices α, y se presentan en la membrana como trímeros. Las porinas son canales transmembrana llenos de agua cuyo diámetro oscila entre 6 y 23 Å y que tienen cierta selectividad por iones inorgánicos, aunque algunas de ellas permiten la captación de azúcares.

12.7 | SISTEMAS DE TRANSPORTE PASIVO FACILITADO

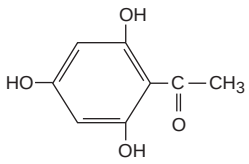
El **transporte pasivo facilitado**, también conocido como **difusión facilitada**, es un mecanismo para la translocación de solutos a través de membranas celulares sin consumo de energía metabólica (véase Tabla 12.5, p. 514). Al igual que en la difusión no

TABLA 12.6 Isoformas principales del transportador de glucosa

Isoforma	*Tejido*	*Localización celular*	*Comentarios*
GLUT1	Músculo Corazón Barrera hematoencefálica Células gliales Placenta	Membrana plasmática	Actividad en el músculo aumentada por insulina, hipoxia y dieta
GLUT2	Hígado Páncreas Intestino Riñón	Membrana plasmática	
GLUT3	Neurona Riñón Placenta	Membrana plasmática	
GLUT4	Músculo Adiposo Corazón Blastocistos	Membrana plasmática	Actividad en músculo y tejido adiposo estimulada por insulina, y en el músculo por hipoxia y dieta
GLUT5	Músculo Espermatozoos	Vesículas sarcolémicas	Fructosa en el sustrato



Floretina



2,4,6-Trihidroxiacetofenona

FIGURA 12.39
Inhibidores del transporte facilitado pasivo de D-glucosa en eritrocitos.

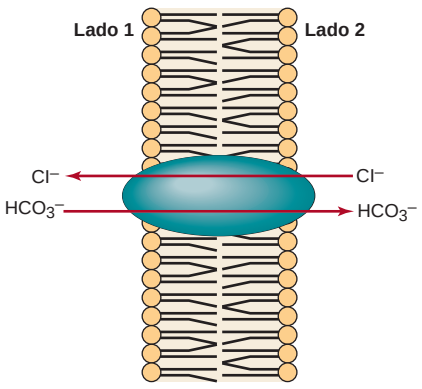


FIGURA 12.40
Mecanismo aniónico "antiport" pasivo para el movimiento de Cl^- y HCO_3^- a través de la membrana plasmática eritrocitaria.

facilitada, la dirección de flujo se produce siempre desde una concentración más elevada a una más baja. Las diferencias que distinguen procesos de simple difusión y transporte pasivo facilitado son la demostración de cinética de saturación, una especificidad estructural hacia la clase de molécula que se mueve a través de la membrana, y una inhibición específica del movimiento del soluto en el segundo caso.

El transporte de glucosa está facilitado

En células de mamíferos se han descrito ocho miembros de una superfamilia de proteínas de membrana que facilitan el transporte de D-glucosa. Las proteínas son productos de genes únicos que se expresan de una manera específica de tejidos. Los **transportadores de glucosa** se denominan GLUT-1, GLUT-2, y así sucesivamente (Tabla 12.6). Todos tienen 12 segmentos hidrofóbicos considerados como las regiones transmembrana y entre ellos existe una similitud de aminoácidos significativa. La mayoría se encuentran en la membrana plasmática, en donde la dirección de movimiento de la glucosa es normalmente de fuera hacia dentro. Sin embargo, GLUT2 puede ser responsable de la exportación de glucosa por las células hepáticas. Los transportadores catalizan un mecanismo "uniport" que presenta actividad máxima con la D-glucosa. Algunas isoformas del transportador pueden translocar D-galactosa, D-manosa, D-arabinosa y otros azúcares de la forma D, así como el glicerol. GLUT5 de las membranas del sarcolema del músculo esquelético transporta preferentemente fructosa. La afinidad del transportador eritrocitario por la glucosa es, con una K_m de aproximadamente 6,2 mM, la más elevada, mientras que para otros azúcares la afinidad es mucho menor. Con eritrocitos aislados, la glucosa puede trasladarse indistintamente hacia dentro o hacia fuera del eritrocito, según sea la dirección del gradiente de concentración establecido experimentalmente, lo que demuestra la reversibilidad del sistema. GLUT4 es un transportador sensible a la insulina. La actividad de algunos GLUT en el músculo está estimulada por el ejercicio y la hipoxia; en estas condiciones existe un aumento en la utilización de glucosa por el músculo. Varios análogos de azúcares, así como la **foretina** y la 2,4,6-trihidroxiacetofenona (Figura 12.39), son inhibidores competitivos.

Cl^- y HCO_3^- se transportan mediante un mecanismo de cotransporte antiparalelo (antiport)

Un sistema de transporte de aniones de los eritrocitos y de los riñones implica el movimiento antiparalelo ("antiport") de Cl^- y HCO_3^- (Figura 12.40). El transportador se conoce como **intercambiador de Cl^- y HCO_3^-**, independiente de Na^+, **proteína de intercambio aniónico** y, en los eritrocitos, **banda 3**; este último por

su posición en la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de las proteínas de la membrana del eritrocito. La dirección del flujo iónico es reversible y depende de los gradientes de concentración de los iones a través de la membrana. El transportador desempeña un papel importante en el ajuste de las concentraciones de HCO_3^- eritrocitarias en la sangre arterial y venosa.

El transportador del riñón es una forma truncada de la proteína del eritrocito y es responsable de la salida de base (HCO_3^-) para equilibrar la salida de H^+ impulsada por el ATP.

La mitocondria contiene diversos sistemas de transporte

La membrana mitocondrial interna contiene varios sistemas de cotransporte entre ellos para el intercambio de aniones entre el citosol y la matriz mitocondrial. En estos se incluye: (1) un transportador para el intercambio de ADP y ATP; (2) otro ("symport") para el intercambio de fosfato y H^+; (3) un transportador de dicarboxilato que cataliza un intercambio de malato por fosfato; y (4) un translocador para el intercambio de aspartato y glutamato (Figura 12.41). La relación de estos transportadores con el acoplamiento energético se tratan en la p. 583. En ausencia de un suministro de energía, estos transportadores catalizan un intercambio pasivo de metabolitos en función del gradiente de concentración, hasta conseguir un equilibrio termodinámico. Como mecanismo de cotransporte antiparalelo, el gradiente de concentración de un compuesto puede impulsar el movimiento de otro soluto. En varios casos, el transportador facilita el movimiento antiparalelo de un número igual de cargas en el sustrato; en dicho movimiento, el potencial de la membrana mitocondrial influye en el equilibrio. El transportador de ADP–ATP y el de fosfato, así como una **proteína desacopladora** (véase p. 586) que transloca H^+, presentan una homología significativa en sus secuencias de aminoácidos, y probablemente provienen de un antepasado común. Se ha propuesto que cada subunidad tendría seis hélices α transmembrana. La proteína desacopladora se localiza en las mitocondrias del tejido adiposo pardo, y se cree que interviene en la producción de calor.

El **transportador** de **ATP–ADP** es muy específica para el ATP y ADP pero no transporta AMP ni otros nucleótidos. La proteína representa aproximadamente el 12% de la proteína total de la mitocondria de corazón. La proteína es muy hidrofóbica y puede existir en dos conformaciones. El **atractilósido** y el ácido **bongkrékico** (Figura 12.42) son inhibidores específicos, y cada uno de ellos reacciona, aparentemente, con

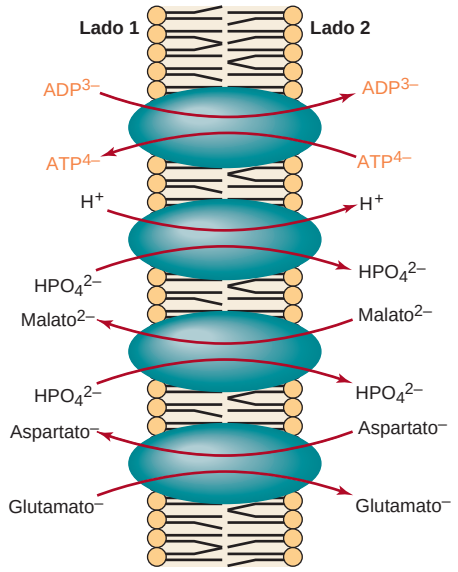
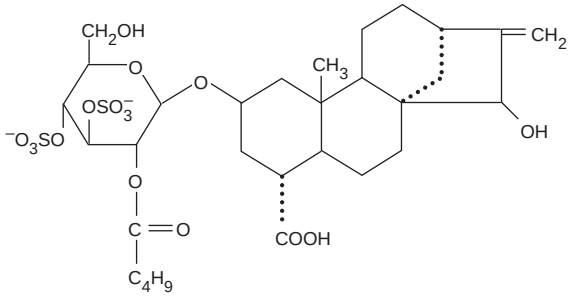
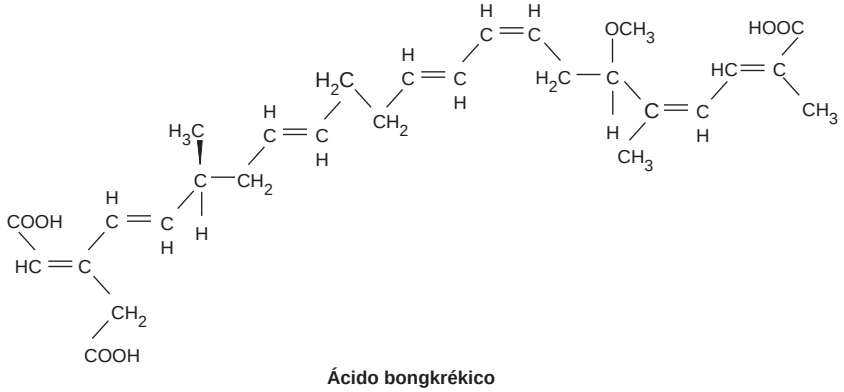


FIGURA 12.41
Sistemas representativos de transporte de aniones en la mitocondria del hígado. Nótese que todos ellos son mecanismos de cotransporte. Los sistemas de transporte mitocondrial se tratan en el Capítulo 13.



Atractilósido



Ácido bongkrékico

FIGURA 12.42
Estructura de dos inhibidores del sistema de transporte ATP/ADP de la mitocondria hepática.

una conformación diferente de la proteína. El potencial de la membrana mitocondrial puede impulsar el movimiento de nucleótidos por este translocador, pero en ausencia de potencial de membrana funciona como un transportador facilitado pasivo.

12.8 | SISTEMAS DE TRANSPORTE FACILITADO ACTIVO

Los transportadores con sistema de transporte facilitado activo poseen las tres mismas características que los transportadores facilitados pasivos, a saber: cinética de saturación, especificidad de sustrato y posibilidad de inhibición (véase Tabla 12.5). Requieren, además, la utilización de energía para translocar solutos. Estos transportadores se clasifican en **transportadores activos primarios**, si necesitan utilizar directamente ATP, y **en transportadores activos secundarios**, si emplean el gradiente electroquímico transmembrana de Na^+ o H^+ (Figura 12.43). Los transportadores que utilizan ATP se conocen también como ATPasa, una actividad enzimática, debido a que el ATP se hidroliza a ADP y fosfato durante la translocación.

Los transportadores activos primarios se clasifican como **transportadores de tipo P** si la proteína se fosforila y desfosforila durante la actividad de transporte. Los de tipo **V**, de **vacuola**, son responsables de la acidificación (bombas de protones) del interior de los lisosomas, endosomas, vesículas de Golgi y vesículas secretoras. Los **transportadores del tipo F** están implicados en la síntesis del ATP y están presentes en mitocondrias y cloroplastos (véase p. 579).

Los transportadores facilitados activos secundarios, utilizan el gradiente electroquímico transmembrana de Na^+ o H^+, para impulsar el transporte de azúcares y aminoácidos. El mantenimiento de un gradiente de Na^+ a través de las membranas celulares se consigue mediante el gasto de ATP (Figura 12.43) gracias a la actividad de un transportador activo primario. La inhibición de la síntesis del ATP provoca la disipación del gradiente de Na^+, lo cual, a su vez, da lugar a la interrupción de la actividad del transporte.

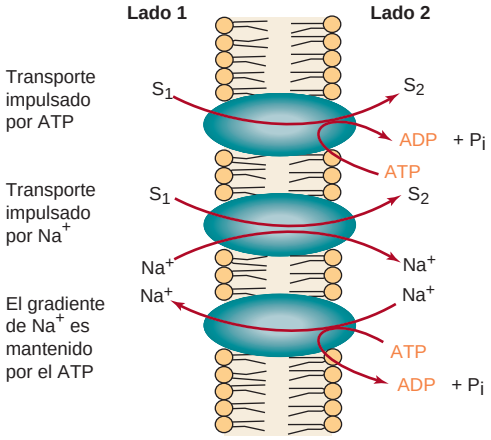


FIGURA 12.43
Implicación de energía metabólica (ATP) en sistemas de transporte facilitado activo. La energía química liberada en la hidrólisis del ATP a ADP y fosfato inorgánico se utiliza para propulsar el transporte activo de varias sustancias, incluido el Na^+. El gradiente de concentración transmembrana de Na^+ se utiliza también para el transporte activo de sustancias.

La translocación de Na^+ y K^+ es un sistema primario de transporte activo

Todas las células de mamíferos contienen un sistema de transportador de Na^+,K^+, del tipo P, que utiliza ATP para impulsar la translocación de Na^+ y K^+. El conocimiento de este transportador se logró por dos vías: (1) por estudios de un enzima de membrana que cataliza la hidrólisis del ATP y que requiere iones Na^+ y K^+ (la actividad se denominó Na^+,K^+–ATPasa) y (2) por medidas del movimiento de Na^+ y K^+ a través de membranas plasmáticas intactas, movimiento debido a una proteína, conocida como bomba de Na^+,K^+, o simplemente bomba de Na^+. Ambas actividades son catalizadas por la misma proteína, la **ATPasa intercambiadora de Na^+ y K^+**; es frecuente referirse simplemente a la **Na^+,K^+-ATPasa** o según su nombre sencillo, **bomba de Na^+.**

Todas las membranas plasmáticas contienen una ATPasa activada por Na^+ y K^+

Todas las membranas plasmáticas catalizan la reacción

$$ATP \xrightarrow[Mg^{2+}]{Na^+ + K^+} ADP + P_i$$

por una ATPasa que necesita de manera absoluta tanto iones Na^+ como K^+, así como Mg^{2+}, que se necesita como cofactor en las reacciones que requieren ATP. El nivel de la ATPasa en las membranas plasmáticas está relacionado con la actividad transportadora de Na^+,K^+. Los tejidos excitables, tales como el músculo y el nervio, y las células implicadas activamente en el movimiento de ion Na^+, tales como la glándula salival y la corteza renal, tienen una elevada actividad Na^+,K^+-ATPasa. El transportador es una proteína integral de membrana; es un oligómero que contiene dos subunidades α de unos 110 kDa cada una y dos subunidades β de unos 55 kDa. Existen varias isoformas de ambas subunidades. Las subunidades más pequeñas son glucoproteínas. La Figura 12.44 es una representación esquemática de la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+. La actividad ATPasa requiere fosfolípidos. Durante el transporte, la subunidad mayor es fosforilada y desfosforilada sobre un residuo de

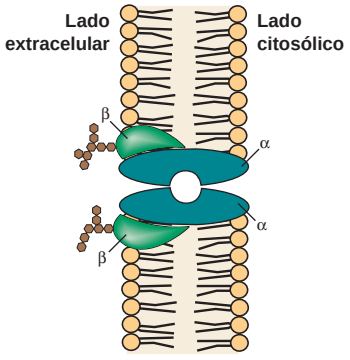


FIGURA 12.44
Representación esquemática de la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+ de la membrana plasmática.

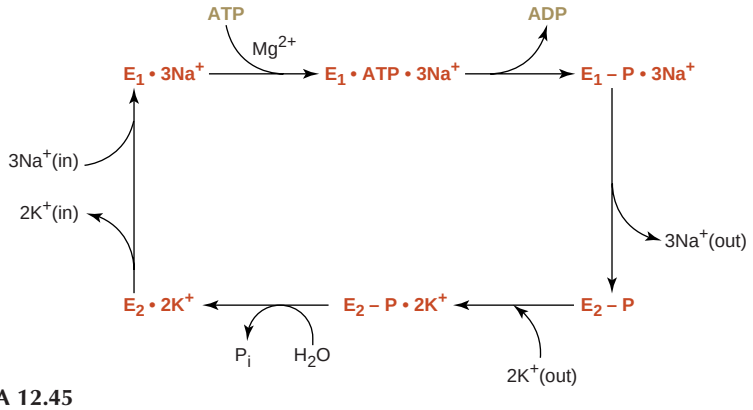


FIGURA 12.45
Secuencia de reacciones propuesta e intermedios en la hidrólisis del ATP por la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+.
E_1 y E_2 son conformaciones diferentes del enzima. La fosforilación del enzima requiere Na^+ y Mg^{2+}, y la desfosforilación implica K^+.

ácido aspártico específico, formando así un β-aspartil fosfato. La fosforilación de la proteína requiere la unión de Na^+ y Mg^{2+}, pero no K^+, mientras que la desfosforilación requiere K^+, pero no Na^+ o Mg^{2+}. En la Figura 12.45 se presentan las reacciones para el enzima. El enzima aislado tiene una necesidad absoluta de Na^+, pero el K^+ puede ser reemplazado por NH_4^+ o Rb^+. Se han observado dos conformaciones diferenciables del complejo proteico, por lo que se dice que la ATPasa es un transportador de tipo E_1–E_2. Diferentes isoformas del transportador estas reguladas por mecanismos diferentes, entre los que se incluyen las concentraciones de sustrato, el citoesqueleto, los inhibidores circulantes y diversas hormonas. Los esteroides cardiotónicos, tales como los de la **digital**, son inhibidores de la Na^+,K^+-ATPasa e incrementan la fuerza de contracción del músculo cardíaco al alterar la excitabilidad del tejido. La **ouabaína** (Figura 12.46) es uno de los inhibidores más activos de la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+; se une a la subunidad menor del complejo enzimático sobre la superficie externa de la membrana y a alguna distancia del centro de unión del ATP en el monómero mayor sobre la superficie interna.

El movimiento de Na^+ y K^+ es un proceso electrogénico antiparalelo en el que salen de la célula tres iones Na^+ y entran dos iones K^+. Esto produce un incremento en la carga positiva externa, lo que es parte del mecanismo para el mantenimiento del potencial transmembrana en las células. La hidrólisis de ATP por el transportador sólo tiene lugar si se translocan el Na^+ y el K^+. Este transportador es responsable de mantener la elevada concentración de K^+ y la baja concentración de Na^+ de las células de mamíferos (véase p. 15).

En la Figura 12.47 se presenta un modelo del movimiento de Na^+ y K^+. La proteína pasa por una serie de cambios conformacionales durante los cuales el Na^+ y el K^+ se desplazan sobre cortas distancias. Durante esta transición conformacional tiene lugar un cambio en la afinidad en el sitio de fijación hacia los cationes, de manera que se produce una disminución de las constantes de afinidad, con el resultado final de la liberación del catión al medio en el que la concentración es superior a la de aquél del que fue transportado.

Como indicativo de la importancia de este enzima, se ha calculado que la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+ utiliza el 60–70% del ATP sintetizado por las células del nervio y músculo, y que puede utilizar alrededor del 35% de todo el ATP generado en un individuo en reposo.

La translocación de Ca^{2+} es otro ejemplo de sistema de transporte activo primario

El ion Ca^{2+} es un importante mensajero intracelular que regula procesos celulares tan variados como la contracción muscular y el metabolismo de glúcidos. La señal iniciada por algunas hormonas, los mensajeros primarios que indican a las células que deben alterar su función, se transmite a través de cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+}; por ello, este catión es un segundo mensajero. La concentración

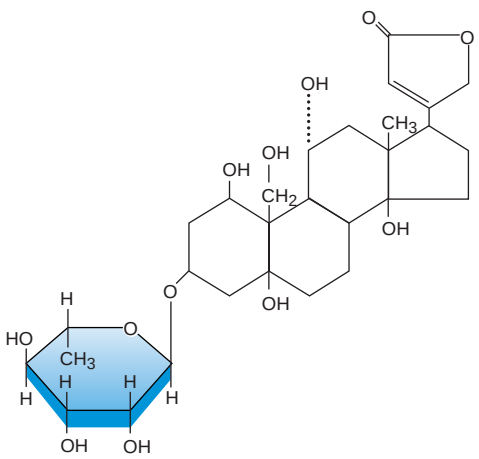


FIGURA 12.46
Estructura de la ouabaína, un esteroide cardiotónico, potente inhibidor de la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+.

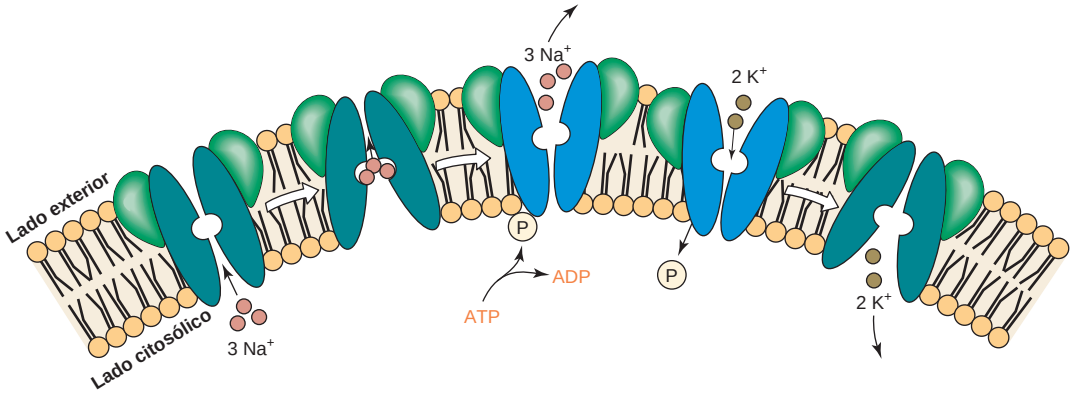


FIGURA 12.47
Modelo hipotético para la translocación de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática por la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+. (1) El transportador en la conformación 1 captura Na^+. (2) El transportador en la conformación 2 transloca y libera Na^+. (3) El transportador en la conformación 2 captura K^+. (4) El transportador en la conformación 1 transloca y libera K^+.

citosólica de Ca^{2+} es del orden de 0,10 μM, unas 10 000 veces menor que la extracelular. La concentración intracelular de Ca^{2+} puede incrementarse rápidamente: (1) por la apertura transitoria de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, lo que permite el flujo del ion a favor de su elevado gradiente de concentración, o (2) por liberación de Ca^{2+} por parte de los depósitos situados en el retículo endoplasmático o sarcoplasmático. Para restablecer las bajas concentraciones citosólicas de Ca^{2+}, éste es transportado activamente a través de la membrana plasmática fuera de la célula, o bien al retículo endoplasmático o sarcoplasmático por una **ATPasa transportadora de Ca^{2+}**. Los diferentes transportadores de Ca^{2+} del tipo E_1–E_2, tienen dos conformaciones y son estructural y mecanísticamente similares a la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+ (Figura 12.48).

La Ca^{2+}–ATPasa del retículo sarcoplasmático del músculo, que interviene en los ciclos de contracción y relajación de éste, constituye el 80% de la proteína integral de la membrana del retículo sarcoplasmático y ocupa un tercio de su área superficial (véase p. 1025). La proteína tiene diez hélices que atraviesan la membrana y se fosforila en un residuo de aspartilo durante la reacción de translocación de Ca^{2+}. Por cada ATP hidrolizado se transportan dos iones Ca^{2+}, y puede mover el Ca^{2+} contra un gradiente de concentración muy grande.

El transportador de Ca^{2+} de las membranas plasmáticas tiene propiedades similares a las de su homólogo del retículo sarcoplasmático. En las células eucarióticas, los niveles citosólicos de Ca^{2+} regulan la actividad del transportador a través de una proteína de unión a calcio llamada **calmodulina**. Cuando el nivel celular de Ca^{2+} se eleva, éste se une a la calmodulina, que tiene una constante de disociación de alrededor de 1 μM. El complejo calmodulina–Ca^{2+} se une al transportador de Ca^{2+} y aumenta la velocidad de transporte de este catión. Esto se consigue mediante el descenso de la K_m del transportador por el Ca^{2+} de 20 a 0,5 μM. El aumento de la actividad del transportador reduce la concentración citosólica de Ca^{2+} a su nivel normal en reposo (~0,10 μM), con lo que el complejo calmodulina–Ca^{2+} se disocia y la actividad del transportador disminuye. El complejo calmodulina–Ca^{2+} controla, pues, de forma precisa al transportador de Ca^{2+}. La calmodulina es una de las proteínas de unión a Ca^{2+}; otras son la **parvalbúmina** y la **troponina C**, cuyas estructuras son muy similares. El complejo calmodulina–Ca^{2+} también interviene en la regulación de otros procesos celulares afectados por el Ca^{2+}. La proteína (17 kDa) tiene forma de pesas de gimnasia, con dos extremos globulares conectados por una hélice α de siete vueltas; hay cuatro sitios de unión de Ca^{2+}: dos de alta afinidad en un lóbulo, y otros dos de baja afinidad en el otro. Se cree que la unión del Ca^{2+} a los sitios de baja afinidad provoca un cambio conformacional en la proteína que expone un área hidrofóbica que puede interactuar con las proteínas que controla. Cada sitio de unión al Ca^{2+} consiste en un patrón estructural hélice–bucle–hélice (Figura 12.49), y el Ca^{2+} se une al bucle que conecta las hélices. Una estructura similar se encuentra en otras proteínas de unión a Ca^{2+}. El patrón se ha denominado **mano EF** a partir de estudios con la parvalbúmina, en la que el Ca^{2+} se une entre las hélices E y F de la proteína.

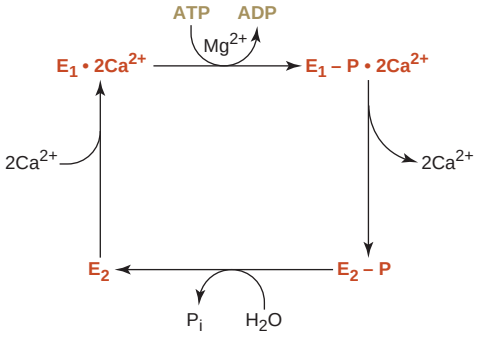


FIGURA 12.48
Secuencia propuesta de reacciones e intermedios en la translocación de Ca^{2+} por la ATPasa transportadora de Ca^{2+}. E_1 y E_2 son diferentes conformaciones del enzima.

Proteínas transportadoras con caset fijadora de ATP

Tanto los eucariotas como los procariotas poseen una serie de transportadores dependientes de ATP notables que pertenecen a una superfamilia de proteínas denominadas **proteínas transportadoras con caset fijadora de ATP (ABC) (ATP-binding casette (ABC) transport proteins)**. El sitio de fijación de ATP de todos estos transportadores comparte una extensa homología secuencial y una organización con conservación del dominio; de ahí el nombre, caset fijadora de ATP, para indicar que la información genética para el sitio de fijación común altamente conservado fue insertado en los genes del segmento transmembrana de los transportadores durante la evolución al igual que una caset se inserta en el reproductor. El dominio ABC constituye la fuerza impulsora para el transporte. Estos transportadores translocan una serie de sustancias entre las que se cuentan iones, metales pesados, azúcares, medicamentos, aminoácidos, péptidos y proteínas. Se han identificado más de 30 transportadores ABC, agrupados en ocho subfamilias. Muchos tienen un amplio margen de especificidad de sustrato. Todos ellos consisten en un dominio que abarca la membrana que reconoce el sustrato y un dominio fijador de ATP.

Dependiendo de la subclase de transportador, la translocación tiene lugar mediante diversos mecanismos diferentes, entre ellos canales, transportadores y receptores. Se sabe poco acerca del mecanismo para acoplar la energía de la hidrólisis del ATP con el movimiento del sustrato. En la especie humana una subfamilia de transportadores ABC está codificada en el DNA por la **familia de genes de resistencia multifármacos (MDR)**. Los productos génicos son glucoproteínas, denominadas **glucoproteínas P**, que transportan una amplia gama de fármacos hidrofóbicos y diversos análogos de lípidos de origen natural tales como la fosfatidilcolina. Las **proteínas asociadas a la resistencia multifármacos (MRP)** tienen una repetición en tándem de seis hélices transmembrana cada una de las cuales contiene un dominio de fijación de ATP. La sobreexpresión de los genes *MDR* lleva a un aumento de la resistencia a una serie de fármacos en muchas células tumorales. Con un aumento en el número de transportadores, los agentes quimioterápicos son rápidamente transportados al exterior de las células con lo que no alcanzan concentraciones intracelulares efectivas. Las glucoproteínas P son responsables de la extrusión desde el interior de la células de una serie de xenobióticos. Otros transportadores glucoproteínas P son responsables de la salida de colesterol desde las células y del transporte de los ácidos biliares a través de la membrana plasmática canalicular de los hepatocitos (véase p. 1083). Otro transportador ABC es el **receptor de sulfonilurea**, que tiene un papel importante en la regulación de la secreción de insulina inducida por la glucosa.

El **regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)** es un miembro singular de la familia de transportadores ABC en cuanto que es a la vez un regulador de conductancia y un canal de Cl^-. El canal permite el movimiento transepitelial de sal y líquido en la membrana plasmática apical de las células epiteliales. Una disfunción del CFTR es la causa de la enfermedad genética fibrosis quística. El CFTR consta de cinco dominios: dos dominios que abarcan la membrana, dos dominios de fijación de nucleótido y un dominio regulador. La

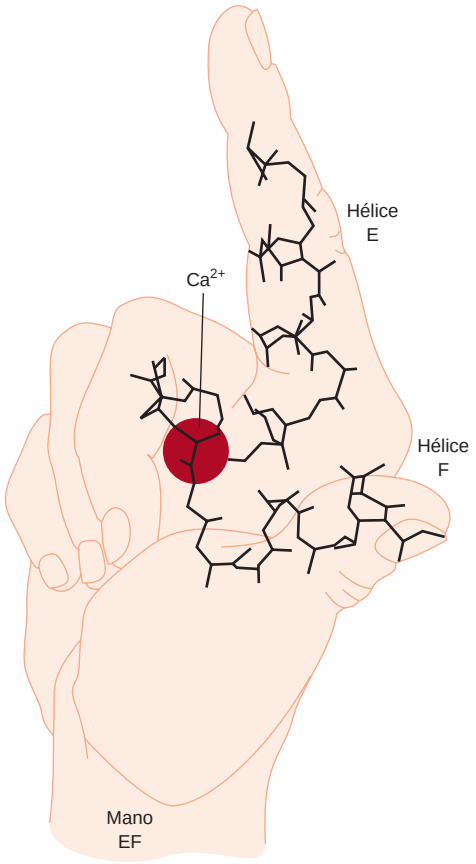


FIGURA 12.49
Sitio de unión de Ca^{2+} en la calmodulina. La calmodulina posee cuatro sitios de unión al Ca^{2+}, cada uno con un patrón hélice–bucle–hélice. El ion Ca^{2+} se une al bucle que conecta las dos hélices. El patrón aparece en varias proteínas fijadoras de Ca^{2+} y se conoce como mano EF.

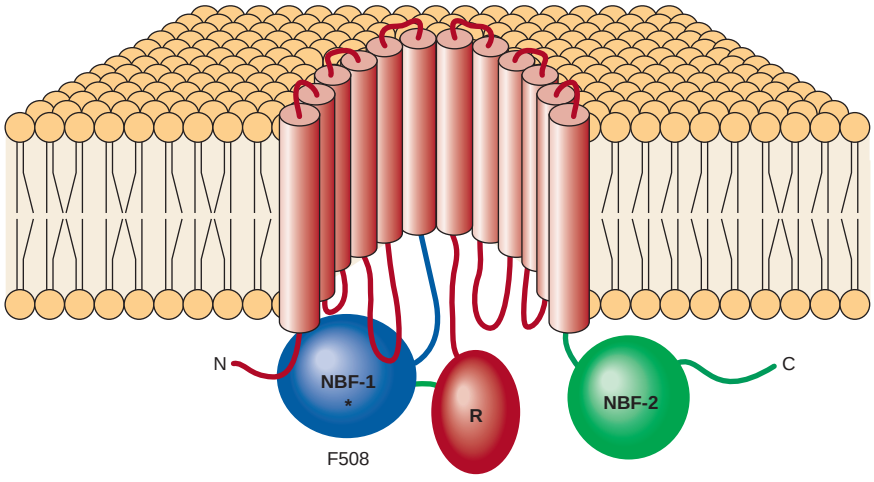


FIGURA 12.50
Diagrama esquemático del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), un miembro de la familia de transportadores ABC. NBF-1 y NBF-2 son subunidades de fijación de ATP, mientras que R es la subunidad reguladora. F508 es el sitio de deleción de la fenilalanina, que tiene lugar en el 70% de los pacientes de fibrosis quística.
Adaptado, con permiso, de un figura en Ko, Y.H. y Pedersen, P.L. Bioenerg. Biomembr. *29:417, 1997*

Figura 12.50 es una representación del CFTR. La fosforilación del dominio regulador regula la actividad de canal y la hidrólisis del ATP por el dominio ABC controla la compuerta del canal. La deleción del residuo de fenilalanina F508 en la subunidad fijadora de ATP NBF-1 (también conocida como NBD-1) es la causa de un 70% de los casos de fibrosis quística. Esta deleción impide el plegamiento adecuado de NBF-1. Entre otras enfermedades genéticas atribuidas a defectos en genes específicos de las proteínas de transporte ABC se cuentan la adrenoleucodistrofia y la enfermedad de Stargardt, una enfermedad degenerativa hereditaria de la mácula lútea que conduce a una rápida pérdida de la agudeza visual.

El transporte de glucosa y de aminoácidos dependiente de Na^+ son sistemas de transporte activo secundario

El gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática (véase la p. 1095) es una fuente de energía para el transporte activo paralelo, junto al Na^+, de azúcares, aminoácidos y Ca^{2+}. En la Figura 12.51 se presenta el mecanismo general para el **cotransportador sodio/glucosa (SGLT)**. El diagrama representa el transporte de D-glucosa impulsado por el movimiento del ion Na^+. En el proceso se mueven dos Na^+ por transporte facilitado pasivo a favor del gradiente electroquímico y la glucosa puede transportarse conjuntamente contra su gradiente de concentración. Durante el transporte el gradiente electroquímico del ion Na^+ se disipa y, a menos que se regenere continuamente, el transporte de glucosa cesa. El gradiente de Na^+ se mantiene mediante el sistema de la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+ descrito anteriormente y también representado en la Figura 12.51. Así, la energía metabólica en forma de ATP está implicada de modo indirecto en el transporte, ya que se requiere para mantener el gradiente iónico de Na^+. La disminución de la concentración celular de ATP, o la inhibición de la ATPasa intercambiadora de Na^+,K^+, produce una disminución del gradiente de Na^+ e impide la captación de glucosa por este mecanismo. Se han identificado más de 35 miembros de la familia génica *SGLT* en células aminales, levaduras y bacterias. Algunas isoformas se expresan en los túbulos renales proximales y en el epitelio del intestino delgado (véase p. 1103 para una discusión de SGLT en la absorción de azúcar). Todos los SGLT tienen una estructura núcleo común de 13 hélices transmembrana; diferentes isoformas tienen más extensiones transmembrana. Los cotransportadores Na^+/glucosa catalizan un movimiento uniport de Na^+ y agua en ausencia de glucosa.

Los aminoácidos se translocan en las células epiteliales luminales de los intestinos mediante un mecanismo de cotransporte paralelo por los **cotransportadores Na^+/aminoácido.** Se han identificado al menos siete cotransportadores diferentes para distintas clases de aminoácidos (para detalles, véase la p. 1099). El gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática también se utiliza para impulsar el transporte de otros iones que incluye un mecanismo de cotransporte paralelo para la captación de Cl^- y un mecanismo de cotransporte antiparalelo para la secreción de Ca^{2+} fuera de la célula. El movimiento de cotransporte paralelo de moléculas que utilizan el gradiente de ion Na^+ implica una interacción cooperativa de los iones Na^+ y de la otra molécula translocada sobre la proteína. Después de la asociación de los dos ligandos se produce un cambio conformacional de la proteína que los desplaza lo suficiente para ponerlos en contacto con el entorno citosólico. La disociación del ion Na^+ del transportador provocada por la baja concentración de ion Na^+ dentro de la célula conduce a un retorno de la proteína a su conformación original y a un descenso en la afinidad y liberación del otro ligando al citosol.

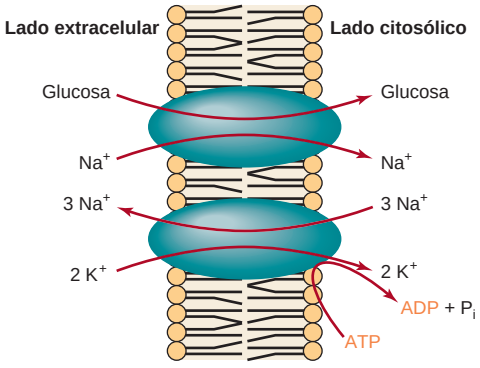


FIGURA 12.51
Transporte paralelo ("symport") de glucosa dependiente de Na^+ en la membrana plasmática.

La translocación de grupo requiere la modificación química del sustrato transportado

Tal como se expuso previamente, un importante obstáculo para cualquier sistema de transporte activo es la liberación de la molécula transportada desde el sitio de fijación después de la translocación. Si no cambiase la afinidad del transportador hacia la molécula translocada, no podría existir traslado contra un gradiente de concentración. En los sistemas de transporte activo descritos previamente, el cambio de la afinidad del transportador hacia el sustrato se debe a un cambio conformacional

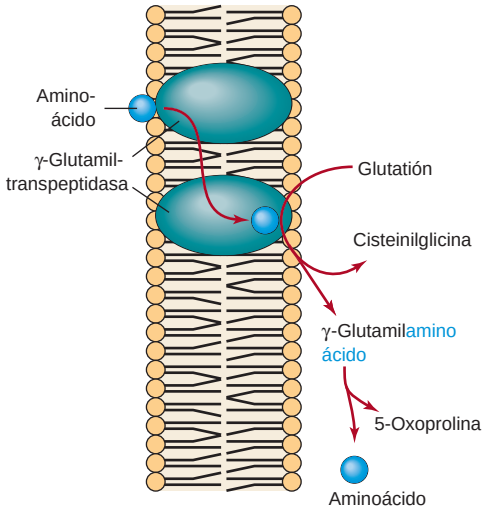


FIGURA 12.52
Ciclo del γ-glutamilo.
Están representadas las reacciones clave implicadas en la translocación de grupo de aminoácidos a través de la membrana plasmática de las células hepáticas. La captación continua de aminoácidos requiere la resíntesis constante de glutatión vía una serie de reacciones que requieren ATP y que se describen en el Capítulo 18, p. 819.

en la proteína. Un mecanismo alternativo para la liberación del sustrato sería la alteración química de la molécula de sustrato cuando aún se encuentra sobre el transportador. El proceso se denomina **translocación de grupo**. El sustrato modificado unido al transportador tiene una afinidad menor por éste, con lo que es liberado. En el **ciclo del γ-glutamilo** para el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática de diversos tejidos el sustrato original es alterado químicamente y liberado en el interior de la célula como una molécula diferente (véase Figura 12.52). La **γ-glutamiltranspeptidasa**, un enzima unido a la membrana, cataliza la transferencia del residuo γ-glutamilo del **glutatión** (Figura 12.53; véase p. 1242) a un aminoácido que se ha de translocar, lo que conduce a la formación de un dipéptido. El dipéptido se libera del translocador debido a su baja afinidad y seguidamente se hidroliza dejando el aminoácido translocado y oxoprolina.

Todos los aminoácidos, excepto la prolina, pueden ser transportados mediante translocación de grupo. La energía para el transporte proviene de la hidrólisis de un enlace peptídico en el glutatión. Para que el sistema continúe, debe resintetizarse el glutatión, lo que requiere el gasto de tres moléculas de ATP (véase p. 1242). La translocación de grupo es un mecanismo energéticamente caro para el transporte de aminoácidos. La vía descrita es activa en muchos tejidos, si bien han aparecido algunas dudas sobre su significación fisiológica al identificarse individuos con una ausencia genética de la actividad γ-glutamiltranspeptidasa sin ninguna dificultad aparente para el transporte de aminoácidos.

Las bacterias poseen un mecanismo de translocación de grupo para la captación de azúcares. La vía implica la fosforilación del azúcar con un grupo fosfato procedente del fosfoenolpiruvato. El mecanismo se conoce como **sistema de fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato (PTS).**

Resumen de los sistemas de transporte

En la exposición anterior se han presentado los principales mecanismos para el movimiento de moléculas a través de membranas celulares, en particular la membrana plasmática. Las células de mamíferos poseen varios sistemas de transporte y, en muchos casos, diferentes mecanismos para translocar el mismo sustrato. La Tabla 12.7 resume las características de algunos de los principales sistemas de transporte hallados en células de mamíferos. Las mismas membranas pueden tener una serie de transportadores diferentes. En muchos casos la velocidad de transporte de una sus-

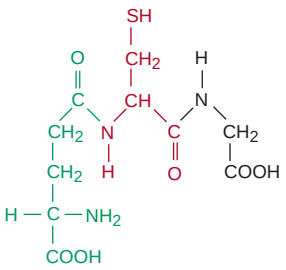


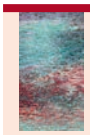
FIGURA 12.53
Glutatión (γ-glutamilcisteinilglicina).

TABLA 12.7 Principales sistemas de transporte en células de mamíferos[a]

Sustancia transportada	*Mecanismo de transporte*	*Tejidos*
Azúcares		
Glucosa	Pasivo	En la mayoría de los tejidos
	"Symport" activo con Na^+	Intestino delgado y células del túbulo renal
Fructosa	Pasivo	Intestinos e hígado
Aminoácidos		
Transportadores específicos de aminoácidos	"Symport" activo con Na^+	Intestinos, riñón e hígado
Todos los aminoácidos excepto prolina	Translocación de grupo activa	Hígado
Aminoácidos específicos	Pasivo	Intestino delgado
Otras moléculas orgánicas		
ATP–ADP	Transporte "antiport" de nucleótidos; puede ser transporte activo	Mitocondrias
Ácido ascórbico	"Symport" activo con Na^+	En la mayoría de los tejidos
Biotina	"Symport" activo con Na^+	Hígado
Colesterol	Activo: transportador ABC	En la mayoría de los tejidos
Ácidos cólico, desoxicólico y taurocólico	"Symport" activo con Na^+ y transportador ABC	Intestinos e hígado
Ácidos dicarboxílicos	"Symport" activo con Na^+	Riñón
Folato	Activo	En la mayoría de los tejidos
Diversos fármacos	Activo: transportador ABC	En la mayoría de los tejidos
Lactato y ácidos monocarboxílicos	"Symport" activo con H^+	En la mayoría de los tejidos
Neurotransmisores (p. ej., ácidos γ-aminobutírico, noradrenalina, glutamato, dopamina)	"Symport" activo con Na^+	Cerebro
Aniones orgánicos (p. ej., malato, α-cetoglutarato, glutamato)	"Antiport" con anión contraorgánico	Mitocondrias
Péptidos (2 a 4 aminoácidos)	"Symport" activo con H^+	Intestinos
Urea	Pasivo	Eritrocitos y riñón
Iones inorgánicos		
H^+	Activo	Mitocondrias
H^+	Activo; ATPasa vacuolar	En la mayoría de los tejidos; lisosomas, endosomas y complejo de Golgi
Na^+	Pasivo	Células de los túbulos renales distales
Na^+, H^+	"Antiport" activo	Células de los túbulos renales proximales e intestino delgado
Na^+, K^+	Activo: impulsado por ATP	Membrana plasmática de todas las células
Na^+, HPO_4^{2-}	Cotransporte activo	Riñón
Ca^{2+}	Activo: impulsado por ATP	Membrana plasmática y retículo endoplasmático (sarcoplasmático)
Ca^{2+}, Na^+	"Antiport" activo	En la mayoría de los tejidos
H^+, K^+	"Antiport" activo	Células parietales de la mucosa gástrica que segregan H^+
Cl^-, HCO_3^-	"Antiport" pasivo	Eritrocitos y riñones

[a]Los sistemas de transporte sólo son indicativos de la variedad de transportadores conocidos; se han propuesto otros que serían responsables del transporte de diversas sustancias. La mayoría de los sistemas se han estudiado solamente en unos pocos tejidos y su localización puede ser más amplia de la indicada. ABC, caset fijadora de ATP.

tancia a través de una membrana está controlada por el número de transportadores en una membrana en un momento dado. Muchas enfermedades genéticas son atribuibles a defectos en sistemas de transporte (véase Apli. Clín. 12.4). Hemos resaltado el papel del Na^+ en el transporte, pero se ha de notar el importante papel del gradiente de protones en la mitocondria (véase p. 577). En procariotas se encuentran una serie de sistemas de transporte análogos a los observados en las células eucarióticas.



APLICACIÓN CLÍNICA 12.4

Enfermedades debidas a la pérdida de sistemas de transporte de membrana

Varias condiciones patológicas se deben a una alteración del sistema de transporte de componentes celulares específicos. Algunas de ellas se abordan en las secciones pertinentes que describen el metabolismo de los intermedios. Se han observado individuos con una disminución de la captación de glucosa del tracto intestinal debido a una pérdida del mecanismo específico de transporte de la glucosa–galactosa dependiente de sodio. Se han observado síndromes de malabsorción de fructosa debidos a una alteración de la actividad del sistema de transporte de la fructosa. En la enfermedad de Hartnup se da una disminución en el transporte de aminoácidos neutros en las células epiteliales del intestino y túbulos renales.

En la cistinuria, la reabsorción renal de cisteína y de los aminoácidos básicos lisina y arginina es anormal, lo que provoca la formación de cálculos renales de cistina. En individuos raquíticos hipofosfatémicos, insensibles a la vitamina D, la aborción renal de fosfato está alterada. Poco se sabe acerca de posibles cambios de las actividades de transporte en tejidos como el músculo, cerebro e hígado, pero es probable que una serie de estados patológicos se deban a la pérdida de sistemas de transporte específicos.

Evans, L., Grasset, E., Heyman, M., et al. Congenital selective malabsorption of glucose and galactose. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4:878, 1985; y Mueckler, M. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219:713, 1994.

12.9 IONÓFOROS

Una interesante clase de antibióticos de origen bacteriano facilita el movimiento de iones inorgánicos monovalentes y divalentes a través de membranas biológicas y sintéticas. Estas moléculas, denominadas **ionóforos**, son compuestos de masa molecular relativamente baja (hasta varios miles de daltons). Los ionóforos se dividen en dos grupos principales: (1) los **transportadores móviles** son los ionóforos que difunden fácilmente en una membrana, transportando el ion de un lado al otro y (2) ionóforos **formadores de canal** que forman un canal que atraviesa la membrana y a través del cual pueden difundir los iones. En la Tabla 12.8 se mencionan algunos de los ionóforos más importantes.

Cada ionóforo tiene una especificidad iónica definida. La valinomicina (Figura 12.54), tiene una afinidad hacia el K^+ 1000 veces mayor que para el Na^+, y el A23187 (Figura 12.55) tiene una afinidad por el Ca^{2+} 10 veces superior que para el Mg^{2+}. Varios de los ionóforos del tipo de difusión tienen una estructura cíclica y el ion metálico se encuentra coordinado a varios oxígenos en el núcleo de la molécula. La periferia de la misma se compone de grupos hidrofóbicos. La quelación del ion por el ionóforo lo despoja de su capa de solvatación circundante encerrándolo dentro de una cubierta hidrofóbica. De este modo el complejo ionóforo–ion difunde libremente a través de la membrana. Dado que la interacción del ion con los ionóforos es una reacción de equilibrio, aparece un estado estacionario en la concentración de iones a ambos lados de la membrana.

La **valinomicina** transporta K^+ mediante un mecanismo electrogénico simple y, al transportar un K^+ cargado positivamente a través de la membrana, crea un gradiente electroquímico a través de la misma. La **nigericina** funciona como un "antiporter" eléctricamente neutro; cuando se disocia su grupo carboxilo capta un ion positivo tal como el K^+, lo que dar lugar a un complejo neutro que atraviesa la membrana. Al volver a difundir de retorno a través de la membrana, transporta un protón; en conjunto se cambia un ion K^+ por un ion H^+. Estos mecanismos se muestran en la Figura 12.56.

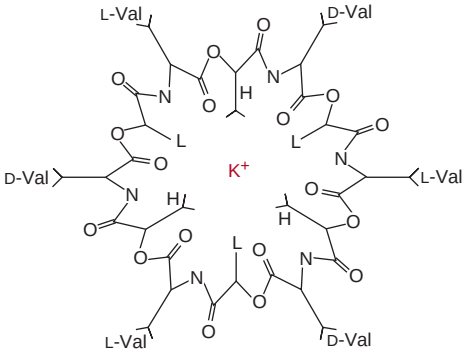


FIGURA 12.54
Estructura del complejo valinomicina–K^+. Abreviaturas: D-Val, D-valina; L-Val, L-valina; L, L-lactato; y H, D-hidroxiisovalerato.

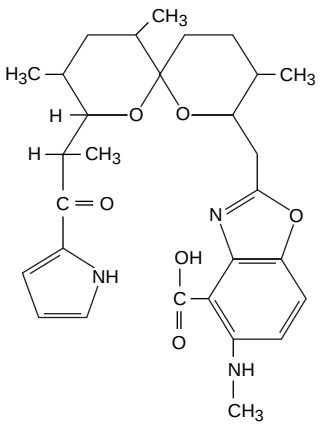


FIGURA 12.55
Estructura del A23187, ionóforo de Ca^{2+}.

TABLA 12.8 Ionóforos principales

Compuesto	*Principales cationes transportados*	*Acción*
Valinomicina	K^+ o Rb^+	"Uniport", electrogénico
Nonactina	NH_4^+, K^+	"Uniport", electrogénico
A23187	Ca^{2+}/2 H^+	"Antiport", electroneutro
Nigericina	K^+/H^+	"Antiport", electroneutro
Monensina	Na^+/H^+	"Antiport", electroneutro
Gramicidina	H^+, Na^+, K^+, Rb^+	Forma canales
Alameticina	K^+, Rb^+	Forma canales

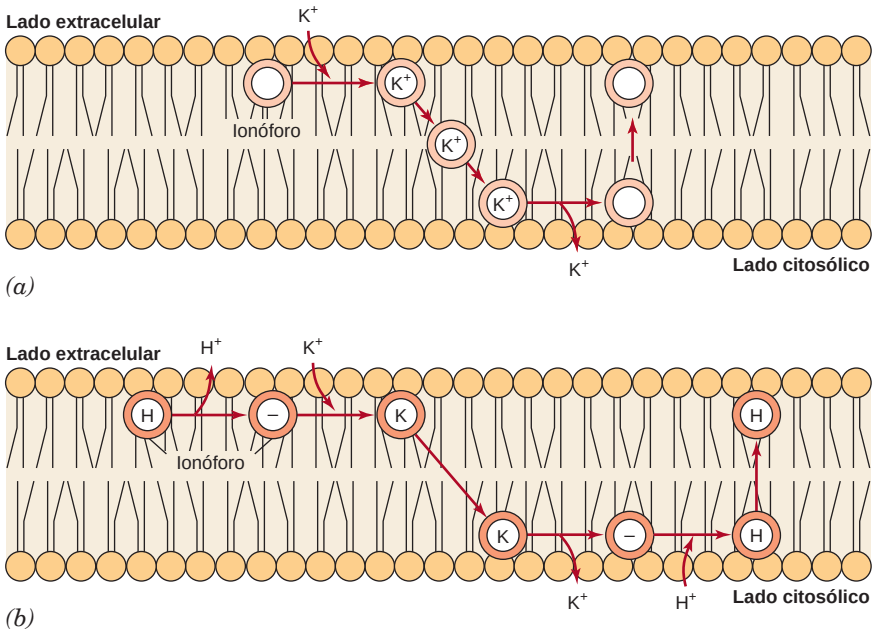


FIGURA 12.56
Mecanismo propuesto para las actividades ionoforéticas de la valinomicina y la nigericina.
(*a*) Transporte por la valinomicina. (*b*) Transporte por la nigericina. El complejo valinomicina–K^+ está cargado positivamente y la translocación del K^+ es electrogénica, lo que conduce a la creación de una separación de carga a través de la membrana. La nigericina transloca K^+ a cambio de un H^+ a través de la membrana, por lo que el mecanismo es eléctricamente neutro.
Diagrama adaptado de B. C. Pressman, Annu. Rev. Biochem. *45:501, 1976.*

El polipéptido **gramicidina A** forma un canal cuando dos moléculas en una membrana forman un puente de hidrógeno en sus extremos terminales formando un dímero que ocupa toda la membrana (véase Figura 12.57). Los iones pueden difundir a través del canal acuoso formado. La asociación y disociación de los monómeros controla la velocidad de flujo iónico. Grupos peptídicos polares revisten el canal y en la periferia del mismo se encuentran grupos hidrofóbicos que interaccionan con la membrana lipídica. Este tipo de ionóforo presenta una baja selectividad iónica.

Los ionóforos son una herramienta experimental valiosa en los estudios sobre la translocación de iones en las membranas biológicas y para la manipulación de la composición iónica de las células.

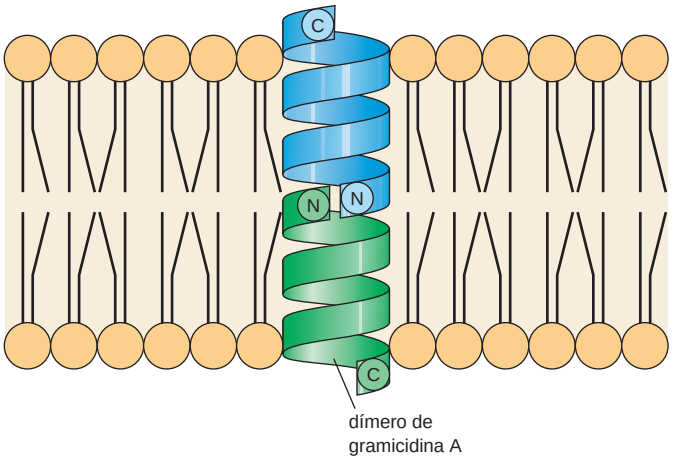


FIGURA 12.57
Acción de la gramicidina A.
Dos moléculas de gramicidina A forman un dímero por formación de puentes de hidrógeno en el extremo amino de los péptidos, con lo que se crea un canal en una membrana.

BIBLIOGRAFÍA

General

Dobler, M. *Ionophores and Their Structure.* New. York: Wiley-Interscience, 1981.

Jones, M. N. *Micelles, Monolayers, and Biomembranes.* New York: Wiley-Liss, 1995.

Lipowsky, R. y Sackmann, E. *Structure and Dynamics of Membranes.* New York: Elsevier Science, 1995.

Papa, S. y Tager, J. M. *Biochemistry of Cell Membranes.* Basel: Birkhauser Verlag, 1995.

Vance, D. E. y Vance, J. E. (Eds.). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes.* Amsterdam: Elsevier, 1996.

Watts, A. *Protein–Lipid Interactions.* New York: Elsevier, 1993.

Yeagle, P. *The Membranes of Cells.* San Diego: Academic Press, 1993.

Estructura de la membrana

Daleke, L. D. y Lyles, J. V. Identification and purification of aminophospholipid flippase. *Biochim. Biophys. Acta* 1486:108, 2000.

Devaux, P. F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30:1163, 1991.

Gregoriadis, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.* 13:527, 1995.

Low, M. y Saltiel, A. R. Structural and functional roles of glycosylphosphatidyl inositol in membranes. *Science* 239:268, 1988.

McMurchie, E. J. Dietary lipids and the regulation of membrane fluidity and function. In: *Physiological Regulation of Membrane Fluidity.* New York: Liss, 1988, p. 189.

Pastor, R. W. Molecular dynamics and Monte Carlo simulations of lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4:486, 1994.

Somerharju, P., Virtanen, J. A. y Cheng, K. W. Lateral organization of membrane lipids. *Biochim. Biophys. A* 1440:32, 1999.

Tien, H. T. y Ottova-Leitmannova, A. (Eds.). *Membrane Biophysics: As Viewed from Experimental Bilayer Lipid Membranes (Planar Lipid Bilayers and Spherical Liposomes).* Amsterdam: Elsevier, 2000.

Procesos de transporte

Agutter, P. S. Intracellular structure and nucleocytoplasmic transport. *Int. Rev. Cytol.* 162B:183, 1995.

Borgnia, B. M., Nelson, S., Engel, A. y Agre, P. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* 68:425, 1999.

Carafoli, E. y Brini, M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:152, 2000.

Catterall, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64:493, 1995.

Chin, D. y Means, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10:322, 2000.

Davis, L. I. The nuclear pore complex. *Annu Rev. Biochem.* 64:865, 1995.

Gould, G. W. y Holman, G. D. The glucose transporter family: structure, function and tissue specific expression. *Biochem. J.* 295:329, 1993.

Hediger, M. A., Kanai, U., You, G. y Nussberger S. Mammalian ion-coupled solute transporters. *J. Physiol.* (*London*) 482:75, 1995.

Holland, I. B. y Blight, M. A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fueling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* 293:381, 1999.

Kakuda, D. K. y MacLeod C. L. Na^+-independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells. *J. Exp. Biol.* 196:93, 1994.

Katz, A. M. Cardiac ion channels. *N. Engl. J. Med.* 328:1244, 1993.

Kurachi, Y., Jan, L. Y. y Lazdunski, M. (Eds.). *Potassium Ion Channels: Molecular Structure, Function, and Diseases.* San Diego: Academic Press, 1999.

Leo, T. W. y Clarke, D. M. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem. Cell. Biol.* 77:11, 1999.

MacLennan, D. H., Rice, W. J. y Green, N. M. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco (endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272:28815, 1997.

Marsh, D. Peptide models for membrane channels. *Biochem. J.* 315:345, 1996.

McGiven, J. D. y Pastor-Anglada, M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem. J.* 299:321, 1994.

Pederson, P. y Carafoli, E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function, and II. Energy coupling and work output. *Trends Biochem. Sci.* 12:146, 186, 1987.

Peracchia, C. (Ed.). *Gap Junctions: Molecular Basis of Cell Communication in Health and Disease.* San Diego: Academic Press, 2000.

Poole, R. C. y Halestrap, A. P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am. J. Physiol.* 264:C761, 1993.

Rudy, B. y Seeburg, P. *Molecular and Functional Diversity of Ion Channels and Receptors.* Proceedings of the N.Y. Academy of Sciences, Vol. 868, 1999.

Scarborough, G. A. Structure and function of the P-type ATPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:517, 1999.

Schultz, S. G. (Ed.). *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders.* New York: Plenum Press, 1996.

Van Winkle, L. J. *Biomembrane Transport.* San Diego: Academic Press, 1999.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Los glicerofosfolípidos y esfingolípidos de las membranas:
   A. todos contienen fósforo.
   B. todos son anfipáticos.
   C. todos tienen cargas individuales pero son zwiteriónicos (sin carga neta).
   D. están presentes en las membranas en cantidades iguales.
   E. todos contienen uno o más monosacáridos.

2. Según el modelo de mosaico fluido de la membrana:
   A. las proteínas están siempre incrustradas en la bicapa lipídica.
   B. el movimiento transversal ("flip-flop") de una proteína en la membrana está favorecido termodinámicamente.
   C. el dominio transmembrana contiene principalmente aminoácidos hidrofóbicos.
   D. las proteínas se distribuyen simétricamente en la membrana.
   E. las proteínas periféricas están unidas a la membrana sólo mediante fuerza no covalentes.

3. Entre las características de los sistemas de transporte facilitado se encuentran:
   A. la unión no específica del soluto al transportador.
   B. la liberación del transportador de la membrana después de realizado el transporte.
   C. una velocidad de transporte directamente proporcional a la concentración de soluto.
   D. la liberación del soluto únicamente si la concentración en el lado final es inferior a la del original.
   E. un mecanismo para la translocación del soluto de un lado a otro de la membrana.

4. ¿Cuál de los siguientes necesita(n) un transportador que una específicamente el soluto?
   A. el transporte facilitado activo.
   B. la unión en hendidura.
   C. el canal de membrana.
   D. la difusión simple.
   E. todos los anteriores.

5. ¿Cuál de los siguientes puede transportar solutos contra gradiente de concentración?
   A. el transporte facilitado activo.
   B. el transporte facilitado pasivo.
   C. los dos sistemas anteriores.
   D. ninguno de los dos sistemas anteriores.

6. El sistema de transporte que mantiene el gradiente de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática celular:
   A. implica un enzima que es una ATPasa.
   B. es un sistema tipo contransporte paralelo (symport).
   C. desplaza el Na^+ tanto hacia el interior como exterior celular.
   D. es un sistema eléctricamente neutro.
   E. en la membrana, hidroliza ATP independientemente del movimiento de Na^+ y K^+.

7. De un sistema de transporte facilitado se esperaría que:
   A. mostrase un incremento continuo de la velocidad inicial de transporte a medida que aumenta la concentración de sustrato.
   B. mostrase esteroespecificidad estructural por la sustancia transportada.
   C. fuese más lento que un sistema de difusión simple.
   D. estableciese un gradiente de concentración a través de la membrana.
   E. exista únicamente en las membranas plasmáticas.

8. La translocación del Ca^{2+} a través de una membrana:
   A. es un transporte facilitado pasivo.
   B. es un ejemplo de sistema de cotransporte paralelo.
   C. implica la fosforilación de un residuo de serina a partir de ATP.
   D. puede regularse por la unión del complejo Ca^{2+}-calmodulina al transportador.
   E. mantiene $[Ca^{2+}]$ mucho mayores en la célula que en el líquido extracelular.

9. El tipo de sistema de transporte de translocación de grupo:
   A. no necesita energía metabólica.
   B. implica el transporte de dos moléculas diferentes de soluto de forma simultánea.
   C. ha sido demostrado para los ácidos grasos.
   D. provoca una alteración de la molécula de sustrato durante el proceso de transporte.
   E. utiliza ATP para mantener un gradiente de concentración.

10. Todo lo siguiente es correcto acerca de un ionóforo EXCEPTO que:
    A. necesita el aporte de energía metabólica para el transporte facilitado de un ion.
    B. puede difundir en ambas direcciones a través de la membrana.
    C. puede formar un canal a través de la membrana por el que puede difundir un ion.
    D. puede catalizar el transporte facilitado electrogénico de un ion.
    E. tiene especificidad por el ion que transporta.

Preguntas 11 y 12: Dos de los principales problemas de la administración oral o intravenosa de medicamentos son la falta de especificidad de tejido en la acción del fármaco y el rápido metabolismo, y en consecuencia el período limitado de efectividad, de algunos medicamentos. Un intento de superar estos problemas es la utilización de liposomas para encapsular los medicamentos. Cuando se administran de esta forma algunos fármacos tienen un periodo de efectividad más largo. Se está investigando la manera de preparar liposomas con un grado elevado de especificidad tisular. Los liposomas también son muy útiles como herramienta de investigación para estudiar las propiedades de las membranas biológicas ya que tienen una estructura y propiedades muy similares. Gran parte de nuestro conocimiento sobre las membranas biológicas se ha obtenido utilizando estas membranas artificiales.

11. Las membranas celulares habitualmente:
    A. están constituidas por un 90% de fosfolípido.
    B. tienen tanto proteínas integrales como periféricas.
    C. contienen ésteres de colesterol.
    D. contienen glúcidos libres, tales como la glucosa.
    E. contienen grandes cantidades de triacilgliceroles.

12. ¿Cuál o cuáles de las siguientes afirmaciones sobre las membranas son correctas?
    A. el principal lípido de la membrana mitocondrial interna es la esfingomielina.
    B. debido al movimiento transversal (flip-flop) la composición lipídica de las dos capas de la membrana está equilibrada.
    C. tal como se ha demostrado con los liposomas, la membrana presenta su mayor fluidez en las superficies.
    D. un aumento en el contenido de colesterol de una membrana disminuye su fluidez.
    E. todas las anteriores son correctas.

Preguntas 13 y 14: La fibrosis quística es una enfermedad genética relativamente frecuente en los caucásicos (1 de cada 2000 nacimientos vivos). Aunque afecta a muchos órganos, la obstrucción pulmonar es un problema principal. Los pacientes de fibrosis quística tienen una permeabilidad del Cl^- disminuida y la enfermedad se puede diagnosticar por la elevada $[Cl^-]$ en el sudor. Mutaciones genéticas dan lugar a defectos en la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que es un canal de Cl^- dependiente de cAMP. La CFTR muestra homología estructural con la superfamilia de los transportadores con caset fijadora de ATP (ABC).

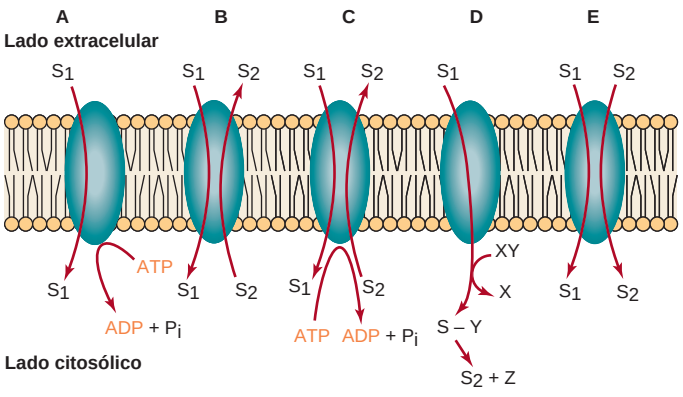
13. Los canales de membrana:
    A. tienen una gran área acuosa en la estructura proteica de forma que no son muy selectivos.
    B. contienen habitualmente hélices α anfipáticas.
    C. se abren y cierran sólo debido a cambios en el potencial de membrana.
    D. son lo mismo que las uniones en hendidura.
    E. permiten a los sustratos desplazarse sólo del exterior al interior de la célula.

14. Los transportadores con caset fijadora de ATP (ABC):
    A. tienen todos un dominio que abarca la membrana que reconoce el sustrato y un dominio de fijación de ATP.
    B. todos ellos efectúan la translocación mediante la formación de canales.
    C. sólo se encuentran en los eucariotas.
    D. todos ellos tienen dos funciones: formación de un canal y regulación de la conductancia.
    E. todos ellos son glucoproteínas P.

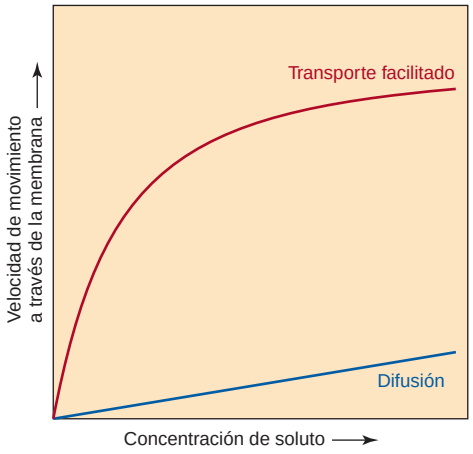
Problemas

15. Dibuje una curva que ilustre la velocidad de movimiento de un soluto a través de una membrana en función de la concentración de soluto para (a) O_2 y (b) captación de glucosa por el eritrocito.

16. Utilizando la figura de abajo, identifique cada uno de los tipos de sistemas de transporte ilustrados con las letras de la A a la E.



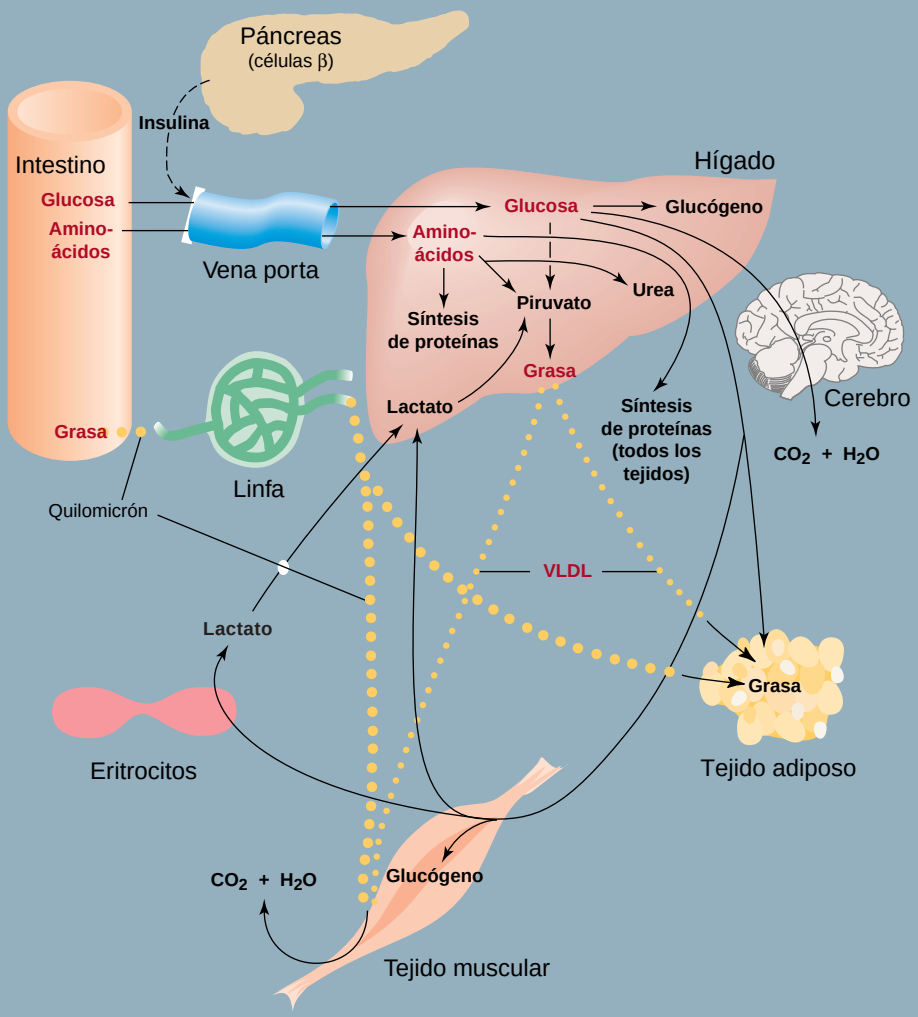
RESPUESTAS

1. **B** Esta propiedad es esencial para su función en las membranas. A: Los esfingolípidos excepto las esfingomielinas no contienen fósforo. C: Los cerebrósidos no están cargados; algunos glicerofosfolípidos y esfingomielinas son neutros; otros tienen carga negativa neta. D: Los glicerofosfolípidos se encuentran normalmente en cantidades mucho mayores que los esfingolípidos. E: Sólo los esfingolípidos, con excepción de la esfingomielina, contienen glúcido.
2. **C** Los dominios hidrofóbicos se encuentran en el interior; los dominios hidrofílicos se encuentran en ambas superficies de la membrana. A: Las proteínas también pueden estar sobre la superficie. B: El movimiento transversal de las proteínas es muy limitado. D: Las proteínas están distribuidas asimétricamente. E: Los glucanos se unen covalentemente a un aminoácido, formando parte así de las anclas de GPI.
3. **E** Esto es esencial para transportar el soluto a través de la membrana. A: La especificidad de fijación es una parte integral del proceso. B: La recuperación del transportador a su condición original es una de las características del transporte facilitado. C: Sólo a bajas concentraciones de soluto; los transportadores muestran cinética de saturación. D: El transporte activo, movimiento contra un gradiente, es también transporte facilitado.
4. **A** La unión específica por parte del transportador es característica de los sistemas facilitados. B–D: No requieren transportador.
5. **A** El transporte contra gradiente exige un suministro de energía.
6. **A** El transportador de Na^+,K^+ es la Na^+,K^+–ATPasa. Es un sistema tipo cotransporte antiparalelo, vectorial (el Na^+ sale) y electrogénico (3 Na^+, 2 K^+). E: Requiere la hidrólisis de ATP.
7. **B** A y B: Los sistemas de transporte facilitado presentan cinética de saturación y especificidad de sustrato. C: El objetivo de los transportadores es ayudar a las sustancias hidrosolubles a atravesar la membrana lipídica. D: Esto es cierto sólo para el transporte activo. E: Los sistemas facilitados también se encuentran en otras membranas, por ejemplo, la membrana mitocondrial.
8. **D** Esto ocurre en la membrana plasmática eucariótica. A y B: La translocación de Ca^{2+} es un "uniport" activo. C: Al igual que en la Na^+,K^+–ATPasa, la fosforilación se produce en un residuo aspartilo. E: La [Ca^{2+}] extracelular es unas 10 000 veces mayor.
9. **D** En algunas células eucarióticas, los aminoácidos son transportados por translocación de grupo, y son convertidos durante el mismo en γ-glutamil aminoácidos. A y E: Es un sistema activo y el ATP es utilizado para resintetizar el intermedio, glutatión. B y C: El sistema transporta un único aminoácido cada vez.
10. **A** Los ionóforos transportan mediante mecanismos facilitados pasivos. B y C: Estos son los dos tipos principales de ionóforos. D: La valinomicina transporta K^+ por un mecanismo tipo transporte simple. Existen también sistemas tipo cotransporte antiparalelo que son electroneutros. E: Por ejemplo, la valinomicina tiene una afinidad hacia el K^+ 1000 veces mayor que para el Na^+.
11. **B** Algunas proteínas están incrustadas en la membrana mientras que otras se encuentran en la superficie. A: Esto es más que el total de lípidos. C: El colesterol de las membranas no está esterificado. D: Todos los glúcidos de las membranas se encuentran en forma de glucoproteínas y glucolípidos. E: Si está presente, es un componente minoritario.
12. **D** El colesterol es una estructura rígida. Su orientación, con el grupo hidroxilo cerca de la superficie y los anillos proyectándose sobre el núcleo hidrofóbico, restringe el movimiento de las cadenas acílicas de los lípidos. A: La fosfatidilcolina es el lípido principal de la mayoría de las membranas. B: El movimiento de un grupo de cabeza cargado a través del núcleo lipofílico de la membrana es termodinámicamente desfavorable. Las dos capas de la membrana no se equilibran. C: El área de mayor fluidez es el centro de la membrana, donde están localizados los extremos metilo de las cadenas acílicas.
13. **B** Las hélices forman, típcamente, el canal, con las cadenas laterales hidrofílicas revistiéndolo y las hidrofóbicas encaradas al núcleo lipídico de la membrana. A: Esta respuesta describe un poro; los canales son bastante específicos. C: Los canales regulados por voltaje, como el del Na^+, se controlan de esta forma; pero otros como el canal nicotínico de acetilcolina, son regulados químicamente. D: Los agrupamientos de canales de membrana operan conjuntamente formando las uniones en hendidura. E: Las sustancias pueden desplazarse en ambas direcciones de acuerdo con el gradiente de concentración.
14. **A** Estas son las características comunes. B: Operan mediante diversos mecanismos entre los que se incluyen transportadores y receptores. C: Los poseen tanto procariotas como eucariotas. D: CFTR es inusual ya que posee ambas funciones. E: Algunos, como por ejemplo los codificados por la familia génica *MDR* o el transportador de colesterol hacia el exterior de las células, son glucoproteínas P, pero otros no lo son.
15. 

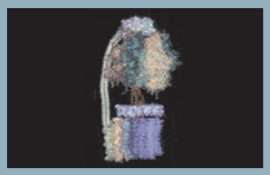
    (a) El O_2 es un gas y atraviesa las membranas por difusión simple, con lo que la velocidad aumenta con la concentración tal como se ilustra mediante la curva inferior de la figura.
    (b) La captación de glucosa por los eritrocitos es un transporte facilitado pasivo, por lo que debería mostrar cinética de saturación tal como se ilustra con la curva superior de la figura.
16. Todos los sistemas ilustrados representan transporte facilitado. A: Simple (uniport) activo. B: cotransporte antiparalelo (antiport) pasivo; por ejemplo, Cl^-–HCO_3^-. C: Cotransporte antiparalelo activo; por ejemplo, Na^+,K^+–ATPasa. D: Translocación de grupo en el que se representa un cambio en S_1 durante el transporte. E: Sistema cotransporte paralelo (symport); en este caso S_1 podría ser glucosa y S_2 podría ser Na^+.

PARTE IV

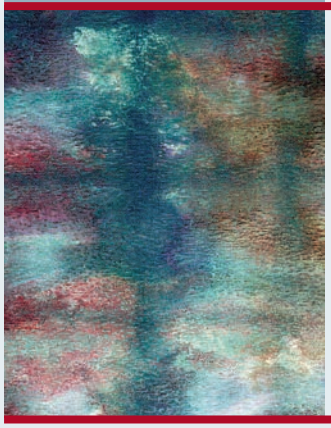
RUTAS METABÓLICAS Y SU CONTROL



Las células transforman la energía química contenida en los alimentos y, en el caso de las plantas, la energía luminosa en una forma que puede ser utilizada para sus diversas funciones. Metabolizan glúcidos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos y sintetizan otras moléculas orgánicas con variados propósitos. En estas rutas metabólicas se dan numerosas interconversiones químicas catalizadas por enzimas que actúan conjuntamente de forma controlada y coordinada. Esto es lo que se representa en la figura de arriba; en la Figura 20.2 se dan más detalles de estas relaciones. Esta Parte se inicia con una exposición sobre la transducción de energía, seguida de una descripción de las rutas metabólicas principales. Se concluye con un capítulo sobre la intergración de estas rutas en diferentes condiciones fisiológicas y patofisiológicas.



13



BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO OXIDATIVO

Diana S. Beattie

13.1 SISTEMAS QUE PRODUCEN Y SISTEMAS QUE UTILIZAN ENERGÍA 538

El ATP es la conexión entre los sistemas que producen energía y los que la utilizan 538
NAD^+ y NADPH en el catabolismo y en el anabolismo 539

13.2 RELACIONES TERMODINÁMICAS Y COMPUESTOS RICOS EN ENERGÍA 540

La energía libre es la energía disponible para el trabajo útil 541
Valor calórico de las sustancias de la dieta 543
Los compuestos se clasifican de acuerdo con la energía liberada en la hidrólisis de grupos específicos 543
Las variaciones de energía libre pueden determinarse en reacciones enzimáticas acopladas 545
Las energías de los enlaces ricos en energía de grupos diferentes se pueden transferir de un compuesto a otro 545

13.3 FUENTES Y DESTINOS DEL ACETIL COENZIMA A 547

Fuentes metabólicas y destinos del piruvato 549
La piruvato deshidrogenasa es un complejo multienzimático 549
La piruvato deshidrogenasa se regula de forma estricta 550
El acetil CoA se utiliza en varias rutas diferentes 552

13.4 CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS 552

Reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos 553
La conversión del grupo acetilo del acetil CoA en CO_2 y H_2O conserva energía 557
El ciclo de los ácidos tricarboxílicos sirve de fuente de intermediarios biosintéticos 558
Las reacciones anapleróticas restablecen los intermediarios de ciclo de los ácidos tricarboxílicos 559
La actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos está cuidadosamente regulada 560

13.5 ESTRUCTURA Y COMPARTIMENTACIÓN MEDIANTE LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES 561

Las membranas mitocondriales interna y externa tienen diferente composición y función 563

13.6 CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO 564

Reacciones de oxidación–reducción 564
Variaciones de energía libre en las reacciones redox 565
El transporte de electrones mitocondrial es un sistema multicomponente 566
Complejo I: NADH-Ubiquinona oxidorreductasa 567
Complejo II: Succinato-ubiquinona oxidorreductasa 569
Otras deshidrogenasas flavoproteínas mitocondriales 569
Complejo III: Ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa 570
Citocromos 571
Mecanismo del ciclo Q para la transferencia de electrones y bombeo de protones en el complejo III 572
Se ha propuesto el movimiento de la proteína ferrosulfurada durante la transferencia electrónica en el complejo III 572
El citocromo *c* es un transportador de electrones móvil 573
Complejo IV: Citocromo *c* oxidasa 573
Rutas de transferencia electrónica a través del complejo IV 574
El complejo IV también bombea protones 575
Visión global de la cadena de transporte electrónico incluidos los inhibidores 575

13.7 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA 577

Acoplamiento de la síntesis de ATP con el transporte electrónico 577
Razones P/O para el transporte electrónico mitocondrial y fosforilación oxidativa 578
Efecto de desacopladores e inhibidores del sistema de transporte electrónico-fosforilación oxidativa 578
ATP sintasa 579
Síntesis de ATP sobre la superficie de F_1 580
Estudios estructurales sobre la ATP sintasa 581

13.8 LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES INTERNAS POSEEN SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SUSTRATOS 583

Transporte de nucleótidos de adenina y de fosfato 583
Las lanzaderas de sustrato transportan equivalentes de reducción a través de la membrana mitocondrial interna 584

El citrato transporta unidades de acetilo 585
La mitocondria posee un mecanismo específico de transporte de calcio 585
Proteínas desacopladoras 586

13.9 GENES MITOCONDRIALES Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES 587

13.10 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) 590

Producción de especies reactivas de oxígeno 590
Lesiones producidas por especies reactivas de oxígeno 591
Defensas celulares contra las especies reactivas de oxígeno 592

BIBLIOGRAFÍA 592

PREGUNTAS 593

RESPUESTAS 594

APLICACIONES CLÍNICAS

13.1 Deficiencia de piruvato deshidrogenasa 552
13.2 Deficiencia de fumarasa 557
13.3 Envenenamiento por cianuro 577
13.4 Neuropatía óptica hereditaria de Leber 588
13.5 Miopatías mitocondriales debidas a mutaciones en genes de tRNA 589
13.6 Intolerancia al ejercicio en pacientes con mutaciones en el citocromo *b* 589
13.7 Lesión isquemia/reperfusión 591

13.1 SISTEMAS QUE PRODUCEN Y SISTEMAS QUE UTILIZAN ENERGÍA

Las células vivas están compuestas por un sistema complejo de reacciones químicas que producen energía y de reacciones químicas que utilizan energía. Este sistema se denomina metabolismo y está regulado de forma intrincada. El metabolismo consiste en dos procesos opuestos, **catabolismo** y **anabolismo**, que representan la suma de cambios químicos que convierten los alimentos en formas utilizables de energía y en moléculas biológicas complejas. El catabolismo implica la degradación de los alimentos ingeridos o los combustibles almacenados, tales como glúcidos, lípidos o proteínas, en formas de energía utilizables o almacenables. Estas reacciones normalmente convierten grandes moléculas complejas en moléculas más pequeñas (CO_2 y H_2O en último término) y en los mamíferos frecuentemente consumen oxígeno durante el proceso. Las reacciones que utilizan energía realizan diversas funciones celulares necesarias, en algunos casos específicas de tejido, como por ejemplo la conducción del impulso nervioso, la contracción muscular, el crecimiento y la división celular. Las reacciones catabólicas son, generalmente, exergónicas y la energía liberada se utiliza normalmente en la formación de ATP. Las reacciones oxidativas del catabolismo también dan lugar a la transferencia de equivalentes de reducción a los coenzimas NAD^+ y $NADP^+$ para formar NADH y NADPH y un protón (H^+). Las rutas anabólicas están implicadas en la síntesis de moléculas grandes y complejas a partir de precursores pequeños, y requieren gasto de energía, bien en forma de ATP, bien en forma de equivalentes de reducción almacenados en el NADPH (Figura 13.1).

El ATP es la conexión entre los sistemas que producen energía y los que la utilizan

En la Figura 13.1 se ilustran las relaciones entre las funciones celulares que producen energía y las que requieren energía. La energía se puede obtener de la oxida-

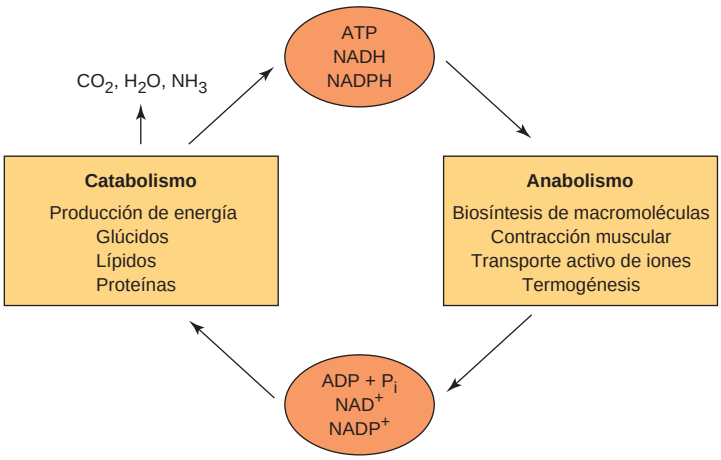


FIGURA 13.1
Relaciones energéticas entre la producción (catabolismo) y la utilización (anabolismo) de energía.
La degradación oxidativa de alimentos es un proceso exergónico que libera energía libre y poder reductor que se captan como ATP y NADPH, respectivamente. Los procesos anabólicos son endergónicos y utilizan energía química almacenada en forma de ATP y NADPH.

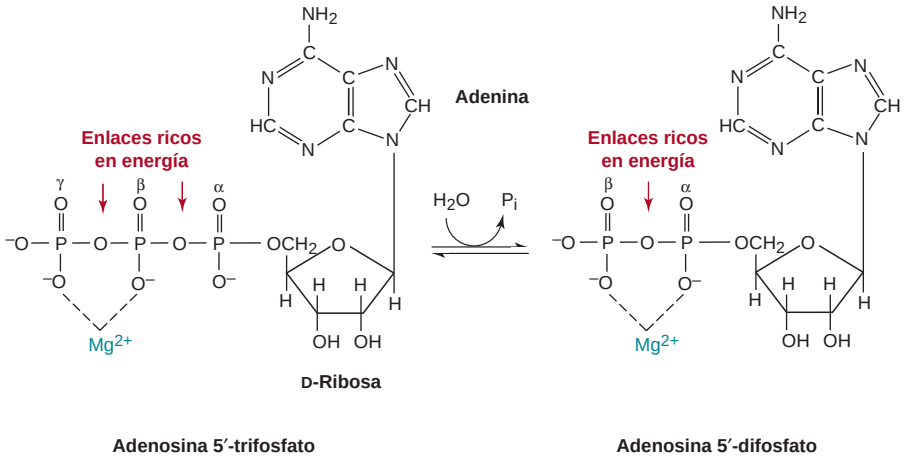


FIGURA 13.2
Estructura de los complejos de ATP y de ADP con Mg^{2+}.
Se destacan los enlaces ricos en energía

ción de combustibles metabólicos, tales como glúcidos, lípidos o proteínas. La proporción de cada uno de estos combustibles que se puede utilizar como fuente de energía depende del tejido y del estado nutricional y hormonal del organismo. Por ejemplo, el eritrocito maduro y el cerebro adulto en estado alimentado utilizan solamente glúcidos como combustible metabólico, mientras que el hígado de un diabético o en ayunas metaboliza principalmente lípidos para satisfacer las necesidades energéticas. La energía se puede consumir durante la realización de diversas funciones ligadas a energía (trabajo), algunas de las cuales se indican en la Figura 13.1. Nótese que el hígado y el páncreas están implicados fundamentalmente en funciones biosintéticas y de trabajo secretor, mientras que el músculo cardíaco y el esquelético están implicados principalmente en la conversión de energía metabólica en energía mecánica durante el proceso de la contracción muscular.

El vínculo esencial entre las vías de producción y de utilización de energía es el nucleósido trifosfato **adenosina 5′-trifosfato (ATP)** (Figura 13.2). El ATP es un nucleótido de purina (adenina) en el cual la adenina está unida por un enlace glucosídico a la D-ribosa. En la posición 5′ de la porción de ribosa están esterificados tres grupos fosforilo en forma de enlaces **fosfoanhídrido**. Los dos grupos fosfato terminales (es decir, β y γ), se denominan **enlaces ricos en energía** o **de alta energía**. La síntesis del ATP como resultado de procesos catabólicos o el consumo de ATP en algún tipo de función celular ligada a energía implica la formación y la hidrólisis o transferencia del grupo fosfato terminal del ATP. La forma fisiológica de este nucleótido está quelada con un catión metálico divalente tal como el magnesio.

NAD^+ y NADPH en el catabolismo y en el anabolismo

Muchos procesos catabólicos son de naturaleza oxidativa porque los carbonos de los sustratos (glúcidos, grasas y proteínas) están en un estado parcial o altamente reducido (Figura 13.3). Los sustratos liberan **equivalentes de reducción** en forma de iones hidruro (un protón que contiene dos electrones $H:^-$) que se transfieren de los sustratos al **nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+)** por medio de enzimas, denominados deshidrogenasas, con formación de NADH (Figura 13.4). El NADH se transporta seguidamente a la mitocondria, en donde los equivalentes de reducción se transfieren en una serie de reacciones de la cadena de transporte electrónico al O_2, que es el aceptor electrónico final. Las reacciones oxidativas de la mitocondria son exergónicas y producen energía que se utiliza para la síntesis de ATP en un proceso denominado **fosforilación oxidativa**. Las reacciones reductoras y oxidativas en el ciclo NAD^+-NADH juegan un papel central en la conversión de la energía química de los compuestos carbonados de los alimentos en energía química de los enlaces anhídrido fosfórico del ATP. Este proceso, llamado transducción de energía, se discutirá en detalle más adelante en este mismo capítulo.

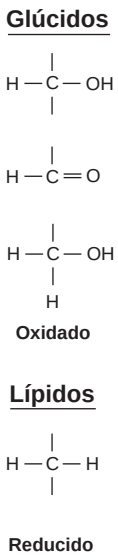


FIGURA 13.3
Estados de oxidación de átomos de carbono típicos pertenecientes a glúcidos y lípidos.

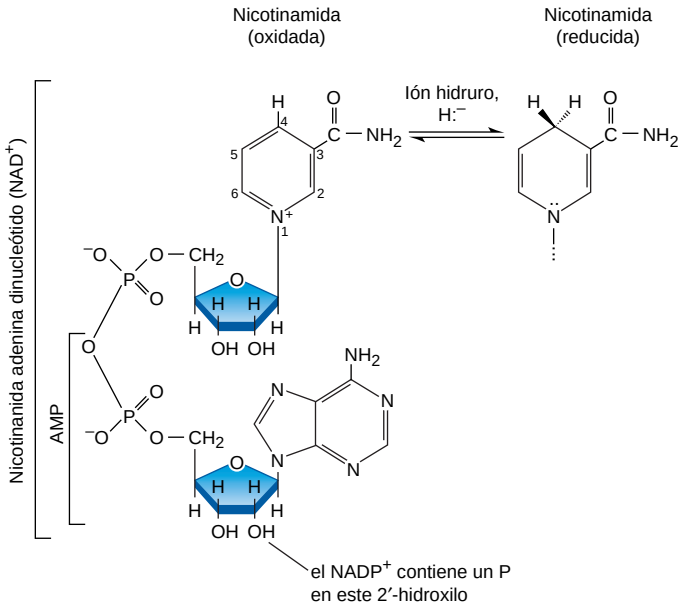


FIGURA 13.4
Estructura del nicotinamida adenina dinucleótido (NAD).
La transferencia del ion hidruro ($H:^-$, un protón con dos electrones) al NAD^+ forma NADH.

El anabolismo, a diferencia del catabolismo, es un proceso principalmente reductor mediante el cual moléculas pequeñas muy oxidadas se convierten en grandes moléculas complejas (Figura 13.1). El poder reductor utilizado en la biosíntesis de compuestos muy reducidos, tales como los ácidos grasos, es proporcionado por el NADPH, que es NAD fosforilado en la posición 2′ (véase p. 426), producido por transferencia de electrones al $NADP^+$ (Figura 13.5).

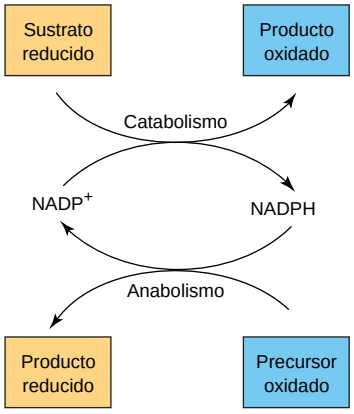


FIGURA 13.5
Transferencia de equivalentes de reducción durante el catabolismo y el anabolismo utilizando NADPH y $NADP^+$.

13.2 RELACIONES TERMODINÁMICAS Y COMPUESTOS RICOS EN ENERGÍA

Debido a que las células vivas son capaces de realizar la interconversión de distintas formas de energía y pueden intercambiar energía con su entorno, es conveniente revisar algunas leyes o principios de la **termodinámica** que rigen las reacciones de este tipo. El conocimiento de estos principios nos dará una idea de cómo las reacciones metabólicas de producción y utilización de energía pueden tener lugar en la misma célula, y cómo un organismo puede realizar diversas funciones de trabajo.

El **primer principio de la termodinámica** indica que la energía ni se crea ni se destruye. Esta ley de conservación de la energía estipula que, aunque la energía se puede convertir de una forma a otra, la energía total del sistema ha de permanecer constante. Por ejemplo, la energía química disponible en un combustible metabólico tal como la glucosa se puede convertir en el proceso de la glucólisis en otra forma de energía química, el ATP. En el músculo esquelético, la energía química presente en los enlaces fosfato ricos en energía del ATP se puede convertir en energía mecánica durante el proceso de la contracción muscular. La energía implicada en un gradiente osmótico electropotencial de protones establecido a través de la membrana mitocondrial puede convertirse en energía química al utilizar dicho gradiente para impulsar la síntesis de ATP.

Para discutir el **segundo principio de la termodinámica** se debe definir el término **entropía**. La entropía (que se designa con el símbolo *S*) es una medida o indicador del grado de desorden en un sistema. La entropía se puede considerar también como la energía de un sistema que no se puede utilizar para realizar trabajo efectivo. Todos los procesos, ya sean químicos o biológicos progresan hacia una situación de máxima entropía. Los sistemas vivos, que tienen un grado de orden muy

elevado, nunca están en equilibrio con su entorno ya que el equilibrio de un sistema se da cuando el desorden (entropía) es máximo. No obstante, en los sistemas biológicos es casi imposible cuantificar cambios de entropía ya que estos sistemas raramente están en equilibrio. Por razones de sencillez y por su utilidad inherente en estos tipos de consideraciones, se empleará la cantidad denominada **energía libre**.

La energía libre es la energía disponible para el trabajo útil

La energía libre (designada con la letra *G* o energía libre de Gibbs) de un sistema es la parte de la energía total del sistema que está disponible para realizar trabajo útil y se puede definir mediante la ecuación

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$$

En esta fórmula, válida para el caso de un sistema que discurra hacia el equilibrio a temperatura y presión constantes, ΔG es la variación en energía libre, ΔH es la variación en entalpía o contenido calórico, T es la temperatura absoluta y ΔS es la variación de entropía del sistema. Si $\Delta G = 0$, el proceso se encuentra en equilibrio y no existe un flujo neto en una u otra dirección de la reacción. Además, cualquier proceso que muestre una variación de energía libre negativa transcurre de manera espontánea hacia el equilibrio en la dirección escrita debido, en parte, a un aumento de la entropía o desorden del sistema. Una tal reacción implica la liberación de energía, y se denomina **reacción exergónica**. Un proceso que muestra una variación de energía libre positiva transcurre espontáneamente en la dirección inversa de la que está escrita; debe aplicársele energía procedente de cualquier otra fuente para que pueda discurrir hacia el equilibrio; este tipo de proceso se denomina **reacción endergónica**. Debe notarse que el signo y valor de ΔG no pueden predecir la velocidad de la reacción. La velocidad de una reacción dada depende de la energía libre de activación, pero no de la magnitud de ΔG. Además, la variación de energía libre de un proceso bioquímico es la misma independientemente de la ruta o mecanismo empleado para alcanzar el estado final. La variación de energía libre de una reacción química está relacionada con la constante de equilibrio de tal reacción. Por ejemplo, una reacción enzimática puede describirse como

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

y la expresión para la constante de equilibrio como

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

En condiciones estándar, cuando reactivos y productos se encuentran presentes inicialmente a concentración 1 M, a 1 atm de presión y una $[H^+]$ 1 M o pH 0, el cambio de energía libre estándar se define como $\Delta G°$. Los bioquímicos han modificado esta expresión y definido la energía libre estándar a pH 7,0 ($[H^+] = 10^{-7}$ M), que es el pH al cual tienen lugar la mayor parte de reacciones biológicas. En estas condiciones la variación de energía libre se expresa en forma $\Delta G°'$ y la constante de equilibrio como K'_{eq} . Dado que en el equilibrio $\Delta G = 0$, se define la siguiente expresión

$$\Delta G°' = -RT \ln K'_{eq}$$

en donde R es la constante de los gases, cuyo valor es 1,987 cal mol^{-1} K^{-1} o 8,134 J mol^{-1} K^{-1}, dependiendo de si la variación de energía libre resultante se expresa en calorías (cal) o joules (J) por mol; y T es la temperatura absoluta en grados kelvin (K).

De ahí que, si se puede determinar la **constante de equilibrio** de una reacción, también puede calcularse su variación de energía libre estándar ($\Delta G°'$). En la Tabla 13.1 se ilustra la relación entre $\Delta G°'$ y K'_{eq}. Cuando la constante de equilibrio se halla por debajo de la unidad, la reacción es endergónica y $\Delta G°'$ es positiva. Cuando la constante de equilibrio es mayor que 1, la reacción es exergónica y $\Delta G°'$ es negativa.

Tal como ya se ha dicho, la $\Delta G°'$ de una reacción define el trabajo disponible en una reacción cuando sustratos y productos están presentes a concentración 1 M. Esta situación no se da en las células, ya que los compuestos raramente se encuen-

TABLA 13.1 Tabulación de valores de K_{eq} y $\Delta G°$

K'_{eq}	$\Delta G°'$ (*kcal mol* $^{-1}$)	$\Delta G°'$ (*kJ mol*$^{-1}$)
10^{-4}	5,46	22,8
10^{-3}	4,09	17,1
10^{-2}	2,73	11,4
10^{-1}	1,36	5,7
1	0	0
10	−1,36	−5,7
10^{2}	−2,73	−11,4
10^{3}	−4,09	−17,1
10^{4}	−5,46	−22,8

tran a concentración 1 M. De ahí que una expresión relacionada con las concentraciones intracelulares reales de sustratos y productos pueda proporcionar datos sobre el trabajo disponible en una reacción. La expresión para obtener ΔG a cualquier concentración de sustrato o producto incluye la variación de energía libre para que una concentración 1 M de sustrato y de producto alcancen el equilibrio ($\Delta G°'$) y la variación de energía para alcanzar una concentración 1 M de sustratos y productos:

$$\Delta G = \Delta G°' + RT \ln \left(\frac{[C][D]}{[A][B]} \right)$$

Por ejemplo, en una célula muscular la concentración de ATP = 8,1 mM, [ADP] = 0,93 mM y P_i = 8,1 mM. Si $\Delta G°'$ para la reacción ATP + HOH $\rightleftharpoons$ ADP + P_i es 7,7 kcal mol^{-1} a 37°C, pH 7,4, el valor de ΔG para la reacción es:

$$\Delta G = \Delta G°' + RT \ln \left(\frac{[ADP][P_i]}{[ATP]} \right)$$

$$\Delta G = \Delta G°' + RT \ln [0{,}93 \times 10^{-3}]$$

$$\Delta G = -7{,}7 \text{ kcal mol}^{-1} + (-4{,}2 \text{ kcal mol}^{-1}) = -12 \text{ kcal mol}^{-1}$$

Estos cálculos demuestran que la cantidad de energía libre asequible para realizar trabajo en una célula muscular es considerablemente superior a la indicada por el valor de $\Delta G°'$. Además, la síntesis de ATP en las células musculares en estas condiciones, la reacción inversa, requeriría +12 kcal mol^{-1} de energía.

En las rutas metabólicas productoras y consumidoras de energía en sistemas celulares las variaciones de energía libre características de cada una de las reacciones enzimáticas en una ruta metabólica son aditivas; por ejemplo

$$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$$

$$\Delta G°'_{A-D} = \Delta G°'_{A \rightarrow B} + \Delta G°'_{B \rightarrow C} + \Delta G°'_{C \rightarrow D}$$

Aunque una reacción enzimática determinada de una secuencia puede tener una variación característica de energía libre positiva, siempre y cuando la suma de todos los cambios de energía sea negativa, la ruta será efectiva. Otra forma de expresar este principio es que reacciones enzimáticas con variaciones de energía libre positivas pueden acoplarse, o impulsarse, por reacciones con variaciones de energía libre negativas asociadas con las mismas. En una ruta metabólica, como por ejemplo la vía de la glucólisis, algunas reacciones individuales tienen $\Delta G°'$ positivas o próximas a cero. Por otro lado, existen otras reacciones que tienen valores de $\Delta G°'$ grandes y negativos que pueden impulsar toda la ruta. La consideración crucial es que la suma de las $\Delta G°'$ de las reacciones individuales de una ruta debe ser negativa para que dicha secuencia metabólica sea termodinámicamente posible. Al igual que todas las reacciones químicas, las reacciones enzimáticas individuales de una vía metabólica, o bien toda una ruta completa, también se ven favorecidas cuando la concentración de los reactivos (sustratos) de la reacción supera la concentración de los productos de la misma.

Valor calórico de las sustancias de la dieta

En la oxidación completa por etapas de la glucosa, uno de los combustibles metabólicos principales en las células, existe una gran cantidad de energía utilizable. La siguiente ecuación establece la cantidad de energía libre que se genera en una célula viva durante la oxidación de la glucosa:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O; \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -686\,000\ \text{cal mol}^{-1}$$

Cuando este proceso tiene lugar en condiciones aeróbicas, en la mayoría de las células existe un potencial para conservar menos de la mitad de esta energía "asequible" en forma de 38 moléculas de ATP. En la Tabla 13.2 se indican las $\Delta G^{\circ\prime}$ y los **valores calóricos** para la oxidación de otros combustibles metabólicos. Los glúcidos y las proteínas (aminoácidos) tienen un valor calórico de 3 a 4 kcal g^{-1}, mientras que los lípidos (es decir, un ácido graso de cadena larga como el palmítico o un triacilglicerol) muestran un valor calórico casi tres veces superior. La razón de que pueda obtenerse más energía de los lípidos que de los glúcidos o las proteínas está relacionada con el estado de oxidación medio de los átomos de carbono en estas sustancias. Los átomos de carbono de los glúcidos están considerablemente más oxidados (o menos reducidos) que los de los lípidos (véase Figura 13.3). De aquí que durante la degradación secuencial de un lípido puedan extraerse tres veces más equivalentes de reducción (un equivalente de reducción se define como un protón más un electrón, a saber, $H^+ + e^-$) que de un glúcido.

Los compuestos se clasifican de acuerdo con la energía liberada en la hidrólisis de grupos específicos

Los dos grupos fosforilo terminales de la molécula de ATP se conocen como **enlaces de alta energía**. Lo que pretende indicar esta descripción es que la energía libre de hidrólisis de dicho enlace fosfoanhídrido rico en energía es mucho mayor que la que se obtendría de un simple enlace éster fosfato. Alta energía no es sinónimo de estabilidad del enlace químico en cuestión, ni se refiere a la energía requerida para romper dichos enlaces. El concepto de compuesto de alta energía implica que los productos de la rotura hidrolítica del enlace rico en energía se encuentran en formas más estables que el compuesto original. Por regla general, los ésteres fosfato simples (compuestos de baja energía) muestran $\Delta G^{\circ\prime}$ negativas de hidrólisis del orden de 1 a 3 kcal mol^{-1}, mientras que los enlaces de alta energía tienen $\Delta G^{\circ\prime}$ negativas del orden de 5 a 15 kcal mol^{-1}. Los ésteres fosfato tales como glucosa 6-fosfato y glicerol 3-fosfato son ejemplos de compuestos de baja energía. La Tabla 13.3 da una lista de varios tipos de compuestos ricos en energía, con los valores aproximados de sus $\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólisis.

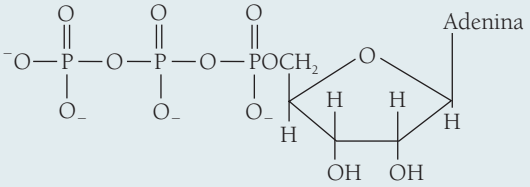
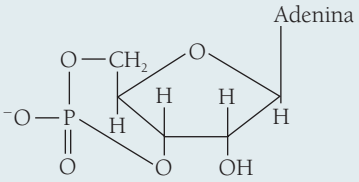
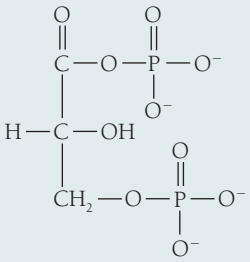
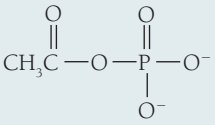
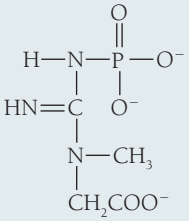
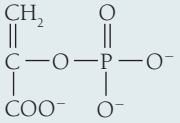
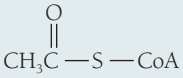
Existen diversas razones por las que ciertos compuestos u ordenamientos de enlaces son ricos en energía. Primero, los productos de la hidrólisis de un enlace rico en energía pueden adoptar más **formas resonantes** que la molécula precursora. La molécula es más estable cuanto mayor es el número de formas de resonancia en las que puede existir. Las formas resonantes del fosfato inorgánico (P_i) se pueden escribir tal como muestra la Figura 13.6. Se pueden escribir menos formas de resonancia para el ATP o el pirofosfato (PP_i) que para el fosfato inorgánico (P_i).

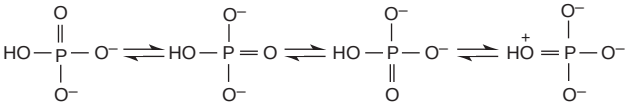
Segundo, muchos ordenamientos de enlaces de alta energía tienen grupos de carga electrostática similar localizados muy próximos entre sí. Debido a que cargas del mismo signo tienden a repelerse, la hidrólisis del enlace rico en energía alivia esta

TABLA 13.2 Variación de energía libre y valores calóricos relacionados con el metabolismo total en diversos combustibles metabólicos

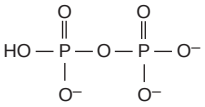
Compuesto	*Masa molecular*	$\Delta G^{\circ\prime}$ *(kcal* mol^{-1}*)*	*Valor calórico (kcal* g^{-1}*)*
Glucosa	180	−686	3,81
Lactato	90	−326	3,62
Palmitato	256	−2380	9,30
Tripalmitina	809	−7510	9,30
Glicina	75	−234	3,12

TABLA 13.3 Ejemplos de compuestos ricos en energía

Tipos de enlace	*$\Delta G°'$ de hidrólisis (kcal mol^{-1})*	*$\Delta G°'$ de hidrólisis (kJ mol^{-1})*	*Ejemplo*
Anhídridos del ácido fosfórico	−7,3	−35,7	 ATP
	−11,9	−50,4	 3′,5′ AMP cíclico
Anhídridos de ácidos fosfóricos y carboxílicos	−10,1	−49,6	 1,3-Bisfosfoglicerato
	−10,3	−43,3	 Acetil fosfato
Fosfoguanidinas	−10,3	−43,3	 Creatina fosfato
Enol fosfatos	−14,8	−62,2	 Fosfoenolpiruvato
Tioésteres	−7,7	−31,5	 Acetil CoA



(a) **Formas de resonancia del fosfato**



(b) **Pirofosfato**

FIGURA 13.6
(*a*) Formas de resonancia del fosfato. (*b*) Estructura del pirofosfato

situación, y también proporciona estabilidad a los productos de hidrólisis. Tercero, la hidrólisis de ciertos enlaces ricos en energía da lugar a la formación de un compuesto inestable que puede isomerizarse espontáneamente para formar un compuesto más estable. La hidrólisis del fosfo*enol*piruvato es un ejemplo de este tipo de compuesto (Figura 13.7). La $\Delta G^{\circ\prime}$ de la reacción de isomerización es considerable, y el producto final, piruvato en este caso, es mucho más estable. Finalmente, si un producto de la hidrólisis de un enlace de alta energía es un ácido no disociado, la disociación del protón de la función ácida y su subsiguiente tamponamiento pueden contribuir a la $\Delta G^{\circ\prime}$ global de la reacción hidrolítica. En general, cualquier propiedad o proceso que proporciona estabilidad a los productos de hidrólisis de un compuesto tiende a conferirle un carácter de alta energía. El carácter de alta energía del **3′,5′-adenosina monofosfato cíclico (cAMP)** se ha atribuido al hecho de que el carácter de enlace fosfoanhídrido de este compuesto se halla forzado debido a que une las posiciones 3′ y 5′ de la ribosa. La riqueza en energía de los compuestos éster tiólicos, tales como el **acetil CoA** o el succinil CoA, proviene del carácter relativamente ácido de la función tiol. De ahí que el enlace tioéster del acetil CoA sea casi equivalente en términos de energía a un enlace fosfoanhídrido que un simple tioéster.

Las variaciones de energía libre pueden determinarse en reacciones enzimáticas acopladas

La $\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólisis del fosfato terminal del ATP es difícil de calcular simplemente porque la K_{eq} de la reacción hidrolítica está muy hacia la derecha.

$$\text{ATP} + \text{HOH} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_\text{i} + \text{H}^+$$

Sin embargo, la $\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólisis del ATP puede determinarse indirectamente gracias a la naturaleza aditiva de las variaciones de energía libre vistas anteriormente. Así, la energía libre de hidrólisis del ATP se puede determinar sumando la $\Delta G^{\circ\prime}$ de una reacción que consuma ATP, como la de la hexoquinasa, y la $\Delta G^{\circ\prime}$ de una reacción en la que se elimine el fosfato del producto de reacción de la hexoquinasa, la glucosa 6-fosfato (G6P), tal como se indica a continuación:

$$\begin{aligned}
&\text{glucosa} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{hexoquinasa}} \text{G6P} + \text{ADP} + \text{H}^+ && \Delta G^{\circ\prime} = -4{,}0 \text{ kcal mol}^{-1}\\
&\text{G6P} + \text{HOH} \xrightleftharpoons{\text{glucosa 6-fosfatasa}} \text{glucosa} + \text{P}_\text{i} && \Delta G^{\circ\prime} = -3{,}3 \text{ kcal mol}^{-1}\\
&\text{ATP} + \text{HOH} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_\text{i} + \text{H}^+ && \Delta G^{\circ\prime} = -7{,}3 \text{ kcal mol}^{-1}
\end{aligned}$$

Las variaciones de energía libre de hidrólisis de otros compuestos ricos en energía pueden determinarse de forma similar.

Las energías de los enlaces ricos en energía de grupos diferentes se pueden transferir de un compuesto a otro

Los compuestos ricos en energía pueden transferir diversos grupos, desde el compuesto inicial (dador), a un compuesto aceptor en una forma termodinámicamente

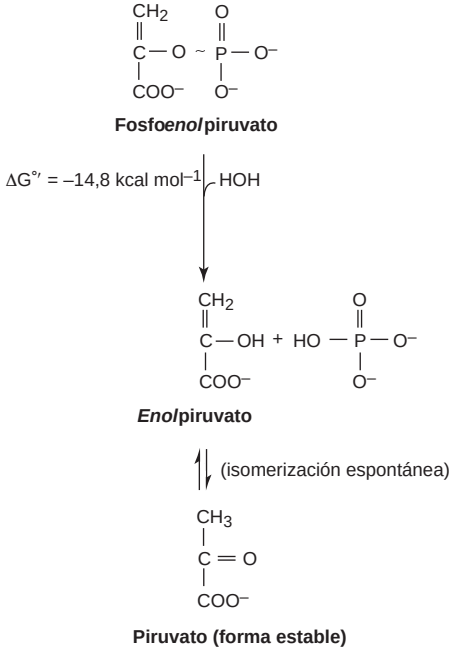


FIGURA 13.7
Hidrólisis del fosfo*enol*piruvato con indicación de la energía libre que se forma.

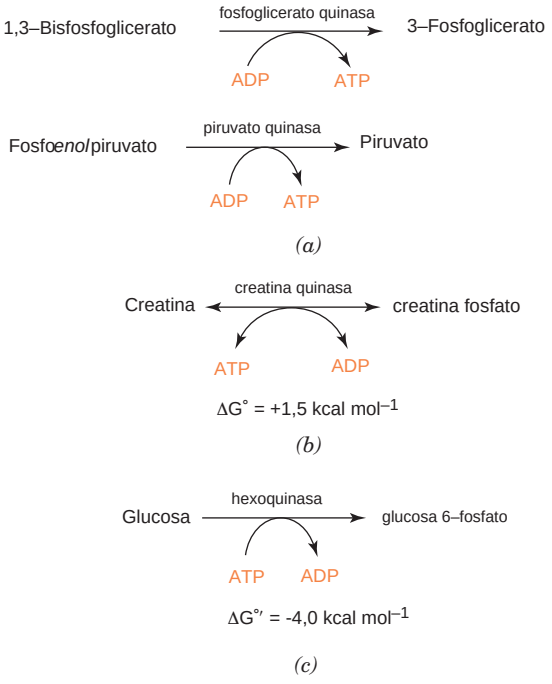


FIGURA 13.8
Ejemplos de reacciones implicadas en la transferencia de fosfato de "alta energía".

factible, siempre y cuando se halle presente un enzima adecuado para facilitar la transferencia. Los intermedios ricos en energía de la ruta glucolítica como el 1,3-bisfosfoglicerato y el fosfo*enol*piruvato pueden transferir su fosfato de alta energía al ATP en las reacciones de la fosfoglicerato quinasa y la piruvato quinasa, respectivamente (Figuras 13.8*a*). Las $\Delta G^{\circ\prime}$ de estas dos reacciones son $-4{,}5$ y $-7{,}5$ kcal mol^{-1}, respectivamente, y, por tanto, la transferencia del fosfato de "alta energía" es termodinámicamente posible; como resultado se obtiene la síntesis de ATP, que puede transferir sus grupos fosforilo terminales de alta energía para formar compuestos de carácter altamente energético relativamente similar [p. ej., creatina fosfato en la reacción catalizada por la creatina quinasa (Figura 13.8*b*)] o compuestos que son de energía considerablemente menor, tales como la glucosa 6-fosfato formada en la reacción de la hexoquinasa (Figura 13.8*c*).

Así, el fosfato u otros grupos transferibles pueden transferirse desde compuestos que contienen enlaces ricos en energía a compuestos que tienen características de enlaces de una energía inferior en reacciones enzimáticas termodinámicamente aceptables. Este principio constituye una premisa de la mayor importancia en la interacción entre rutas metabólicas productoras y consumidoras de energía en las células vivas.

Aunque los nucleótidos de adenina están mayoritariamente implicados en la generación o conservación de energía, diversos nucleósidos trifosfato, incluido el ATP, están implicados en la transferencia de energía en procesos biosintéticos. Tal como se indica en la Figura 13.9, el nucleótido de guanina GTP sirve como fuente de energía en la gluconeogénesis y en la síntesis de proteínas, mientras que el UTP (uracilo)

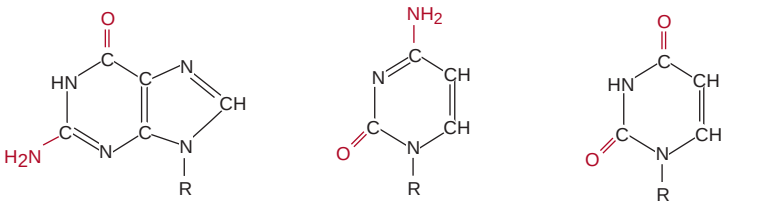


FIGURA 13.9
Estructuras de bases purínicas y pirimidínicas implicadas en diversas vías biosintéticas.
.

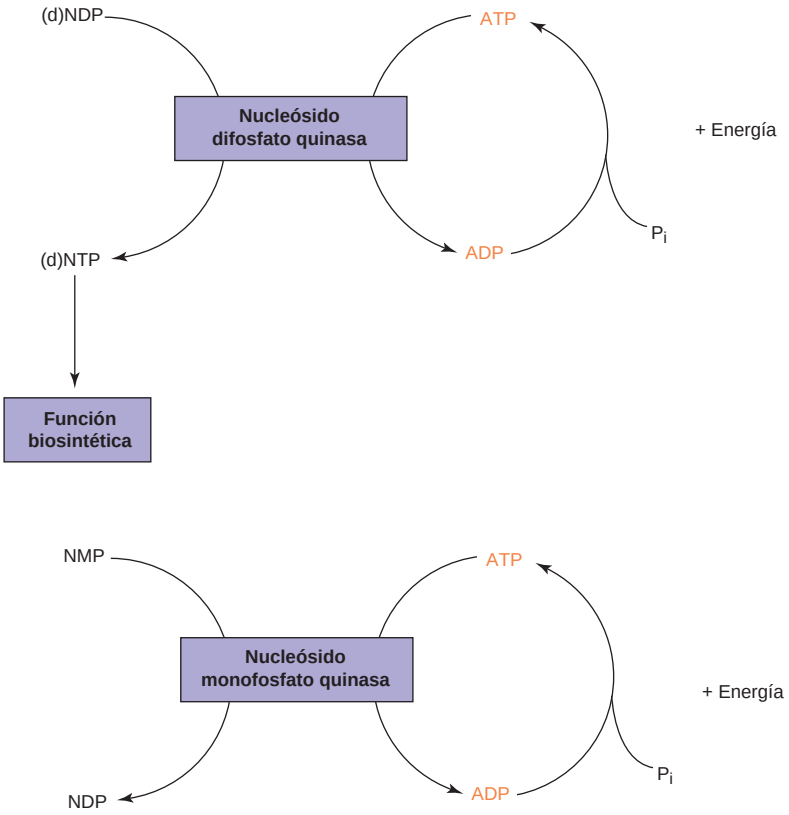


FIGURA 13.10
Reacciones de la nucleósido difosfato quinasa y nucleósido monofosfato quinasa.
N = cualquier base purínica o pirimidínica; (d) señala los desoxirribonucleótidos.

y el CTP (citosina) se utilizan en la síntesis de glucógeno y lípidos, respectivamente. La energía de los enlaces fosfato terminal del ATP puede transferirse a los otros nucleótidos utilizando bien la reacción de la nucleósido difosfato quinasa, bien la de la nucleósido monofosfato quinasa mostradas en la Figura 13.10. Dos nucleósidos difosfato se convierten en un nucleósido trifosfato y un nucleósido monofosfato en diversas reacciones de la nucleósido monofosfato quinasa, tales como la reacción de la adenilato quinasa (Figura 13.11). La importancia de estos tipos de enzimas es que los enlaces fosfato terminales ricos en energía pueden transferirse a los nucleótidos apropiados y ser utilizados en una multitud de procesos biosintéticos.

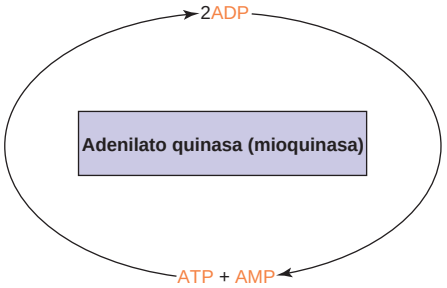


FIGURA 13.11
Reacción de la adenilato quinasa (mioquinasa).

13.3 FUENTES Y DESTINOS DEL ACETIL COENZIMA A

El grupo acetato que sirve de fuente de combustible del ciclo de los **ácidos tricarboxílicos (TCA)** proviene de las principales vías metabólicas generadoras de energía de las células. Tal como se ilustra en la Figura 13.12, entre estas rutas se incluyen la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga en la secuencia de la **β-oxidación**, la degradación de los glúcidos ingeridos o almacenados mediante la vía **glucolítica**, la oxidación de los **cuerpos cetónicos, acetoacetato** y **β-hidroxibutirato**, y la oxidación del etanol, así como la degradación oxidativa de ciertos aminoácidos (Figura 13.12). Todos estos procesos dan lugar a la formación final de la unidad de dos carbonos **acetil coenzimaA** (CoA). Tal como se muestra en la Figura 13.13, el coenzima A, abreviado CoA o CoASH, es una molécula compleja compuesta por β-mercaptoetanolamina, la vitamina **ácido pantoténico** y el nucleótido de adenina, adenosina 3′-fosfato 5′-difosfato. En las células el coenzima se encuentra como tiol reducido (CoASH), que forma enlaces tioéster de alto contenido energético con grupos acilo e interviene en diversas reacciones de transferencia de estos grupos. Como tal, el CoA actúa alternativamente como aceptor, y a continuación como dador, del grupo acilo. Varias rutas metabólicas sólo contienen derivados acilo

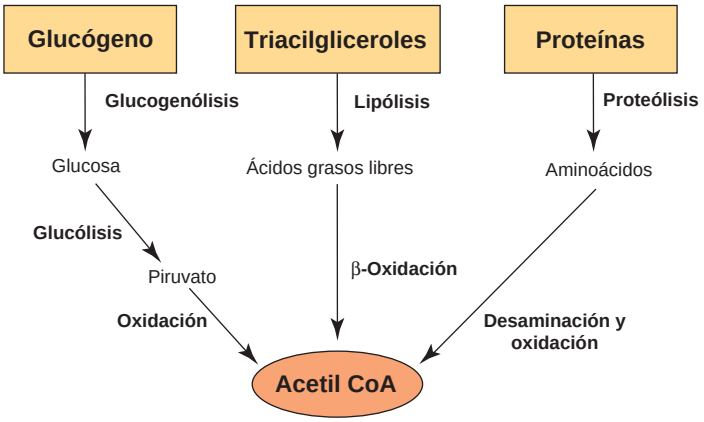


FIGURA 13.12
Precursores generales del acetil CoA.
Glúcidos, lípidos y proteínas se degradan para formar acetil CoA.

del CoA; por ejemplo, la β-oxidación de los ácidos grasos y la degradación de aminoácidos ramificados. Dado que el CoA es una molécula hidrofílica grande, los derivados del CoA tales como el acetil CoA no se transportan libremente a través de las membranas celulares. Esta propiedad ha necesitado la evolución de ciertos mecanismos de transporte o lanzaderas mediante los cuales varios intermedios o grupos pueden ser transferidos a través de las membranas de la célula. En el Capítulo 16 se exponen tales reacciones tipo aciltransferasa, particularmente para grupos acetilo y grupos acilo de cadena larga. Dado que el enlace tioéster de los derivados acil CoA es un enlace rico en energía estos compuestos pueden servir como dadores efectivos de grupos acilo en reacciones de aciltransferasas. Por otro lado, con el fin de sintetizar un derivado acil CoA, como sucede en la reacción de la **acetato tioquinasa**, debe gastarse un enlace rico en energía del ATP,

$$\text{acetato} + \text{CoASH} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{acetato quinasa}} \text{acetil CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

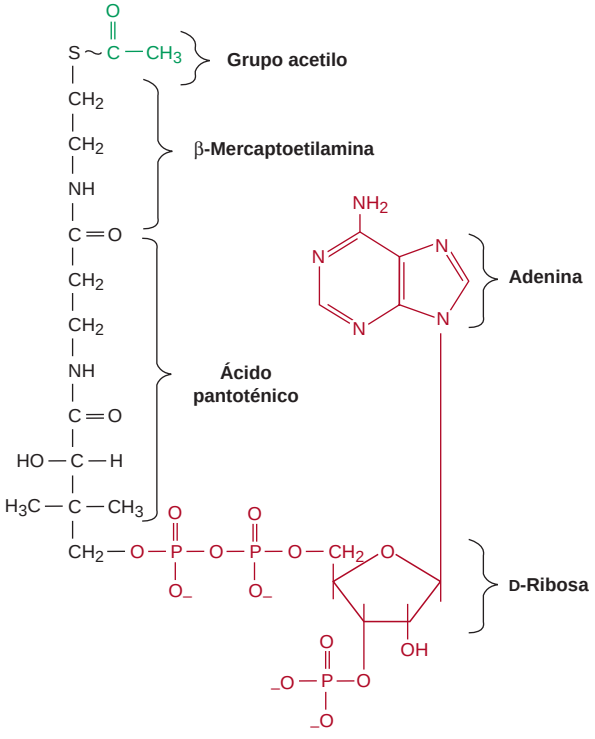


FIGURA 13.13
Estructura del acetil coenzima A.

Fuentes metabólicas y destinos del piruvato

Durante la glucólisis aeróbica (véase p. 599), la glucosa u otros monosacáridos se convierten en piruvato, el producto final de esta vía citosólica. El piruvato, formado en la degradación de aminoácidos tales como la alanina o la serina, tiene una serie de destinos que dependen del tejido y del estado metabólico de ese tejido. Los destinos del piruvato y los tipos de reacciones en los que participa se indican en la Figura 13.14. La descarboxilación oxidativa del piruvato en la reacción de la **piruvato deshidrogenasa** se trata a continuación; véase en la p. 782 una exposición de otras reacciones en las que está implicado el piruvato.

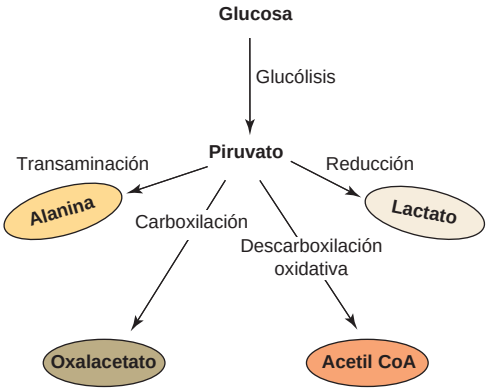


FIGURA 13.14
Destinos metabólicos del piruvato.
El piruvato se encuentra en una encrucijada del metabolismo. El piruvato se puede convertir en lactato, alanina, oxalacetato o acetil CoA según las necesidades de la célula.

La piruvato deshidrogenasa es un complejo multienzimático

El piruvato se convierte en acetil CoA mediante el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa.

$$\text{piruvato} + \text{NAD}^+ + \text{CoASH} \xrightarrow{\text{piruvato deshidrogenasa}} \text{acetil CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+; \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -8 \text{ kcal mol}^{-1}$$

El mecanismo de esta reacción es más complejo de lo que se podría creer a partir de la estequiometría global. Tres cofactores catalíticos, **tiamina pirofosfato** (TPP), **lipoamida** y **flavina adenina dinucleótido** (FAD), están unidos a las subunidades proteicas del complejo aparte de los cofactores estequiométricos, CoASH y NAD^+. La reacción de la piruvato deshidrogenasa tiene una $\Delta G^{\circ\prime}$ de -8 kcal mol^{-1} por lo que, en condiciones fisiológicas, es esencialmente irreversible. El complejo de la piruvato deshidrogenasa de mamíferos consta de tres tipos diferentes de subunidades catalíticas asociadas en un complejo multienzimático con masas moleculares relativas para los complejos obtenidos de riñón, corazón o hígado entre 7 y $8{,}5 \times 10^6$. En la Tabla 13.4 se presentan las subunidades catalíticas con sus cofactores catalíticos asociados.

La estructura del complejo de la piruvato deshidrogenasa obtenido de *E. coli* (masa de partícula $4{,}6 \times 10^6$) se ha visualizado mediante microscopia electrónica. Las micrografías electrónicas del enzima bacteriano (Figura 13.15) indican que la transacetilasa, que consta de 24 cadenas polipeptídicas idénticas (masa molecular relativa = 64 500), constituye el núcleo en forma de cubo del complejo (esferas blancas en el modelo presentado en la Figura 13.15). Doce dímeros de piruvato deshidrogenasa (esferas negras; masa molecular relativa = 90 500) se distribuyen simétricamente sobre las 12 aristas del cubo de la transacetilasa. Seis dímeros de la dihidrolipoil deshidrogenasa (esferas grises; masa molecular relativa = 56 000) se distribuyen sobre las seis caras del cubo. El ordenamiento de estas subunidades en un complejo multienzimático estructurado proporciona una mayor eficiencia en la reacción global del complejo de la piruvato deshidrogenasa ya que los intermedios de la reacción están fuertemente unidos a las subunidades enzimáticas y no se liberan a la solución.

El grupo funcional del TPP participa en la formación de un intermedio covalente (Figura 13.16). El ácido lipoico forma un enlace amida con una lisina de la transacetilasa y se denomina lipoamida, mientras que el FAD está firmemente unido

TABLA 13.4 Complejo de la piruvato deshidrogenasa de mamíferos

Enzima	*Número de cadenas*	*Grupo prostético*	*Reacción catalizada*
Pyruvato deshidrogenasa	20 ó 30	TPP	Descarboxilación oxidativa del piruvato
Dihidrolipoil transacetilasa	60	Lipoamida	Transferencia del grupo acetilo al CoA
Dihidrolipoil deshidrogenasa	6	FAD	Regeneración de la forma oxidada de la lipoamida y transferencia de electrones al NAD^+

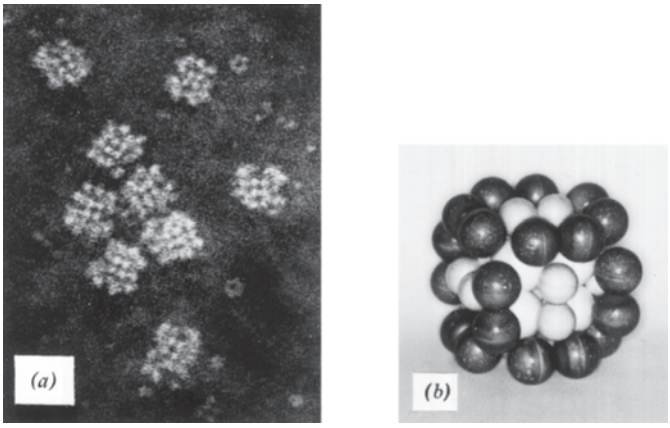


FIGURA 13.15
Complejo de la piruvato deshidrogenasa de *E. coli*.
(*a*) Micrografía electrónica. (*b*) Modelo molecular. El complejo enzimático se tiñó negativamente con fosfotungsteno (× 200 000).
Cortesía del Dr. Lester J. Reed, University of Texas, Austin.

a la subunidad de la dihidrolipoil deshidrogenasa. En las Figuras. 13.4 y 13.13 se presentan las estructuras de NAD^+ y CoASH, respectivamente. El mecanismo de la reacción se ilustra en la Figura 13.17.

La piruvato deshidrogenasa se regula de forma estricta

Se han caracterizado dos tipos de regulación del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Primero, dos de los productos de la reacción de la piruvato deshidrogenasa, el acetil CoA y el NADH, inhiben el complejo de forma competitiva como retroinhibidores. La segunda y más importante regulación del complejo de la piruvato des-

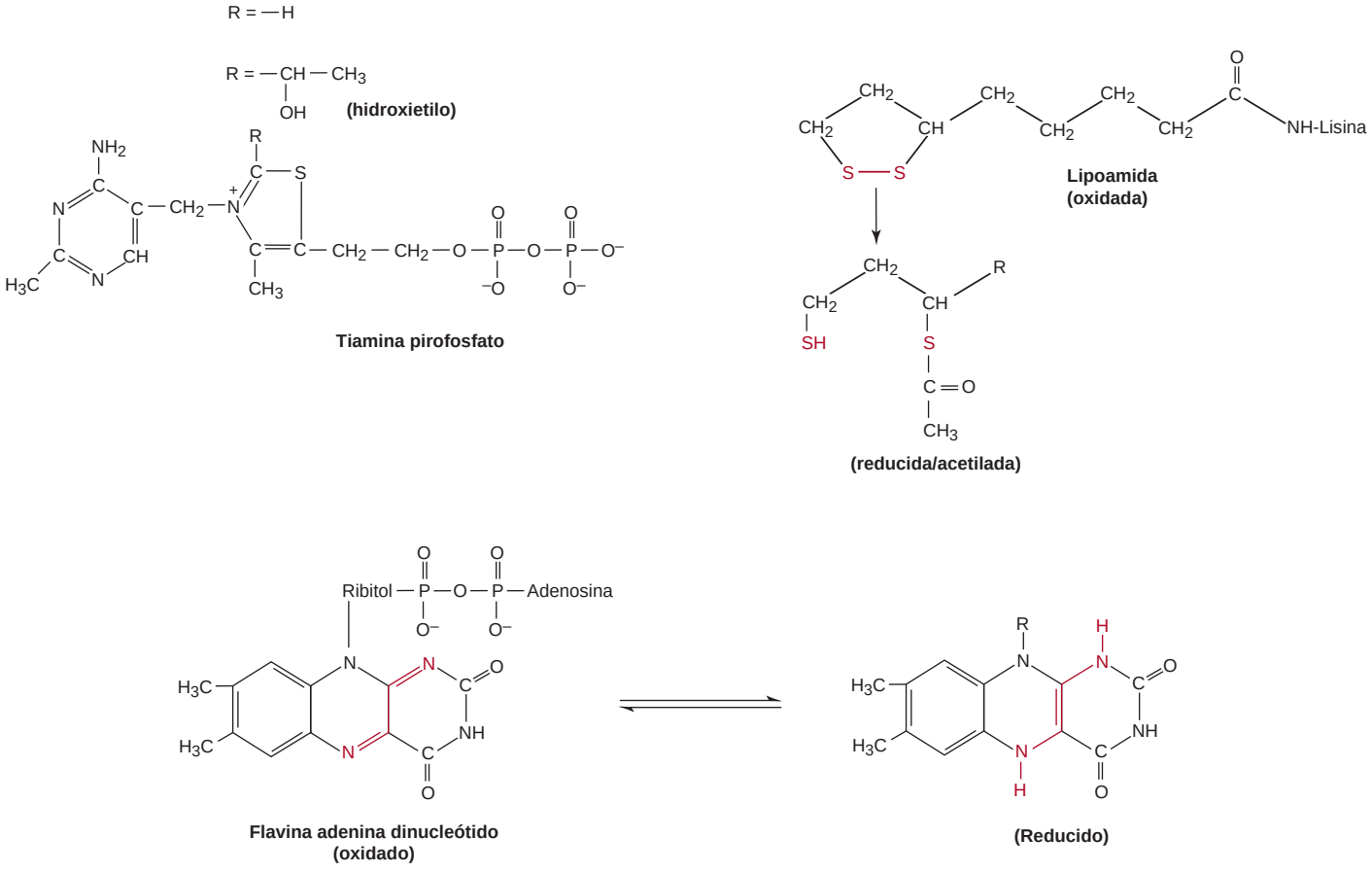


FIGURA 13.16
Estructuras de los coenzimas implicados en la reacción de la piruvato deshidrogenasa.
Véase la Figura 13.4 para la estructura del NAD^+ y la Figura 13.13 para la estructura del CoA.

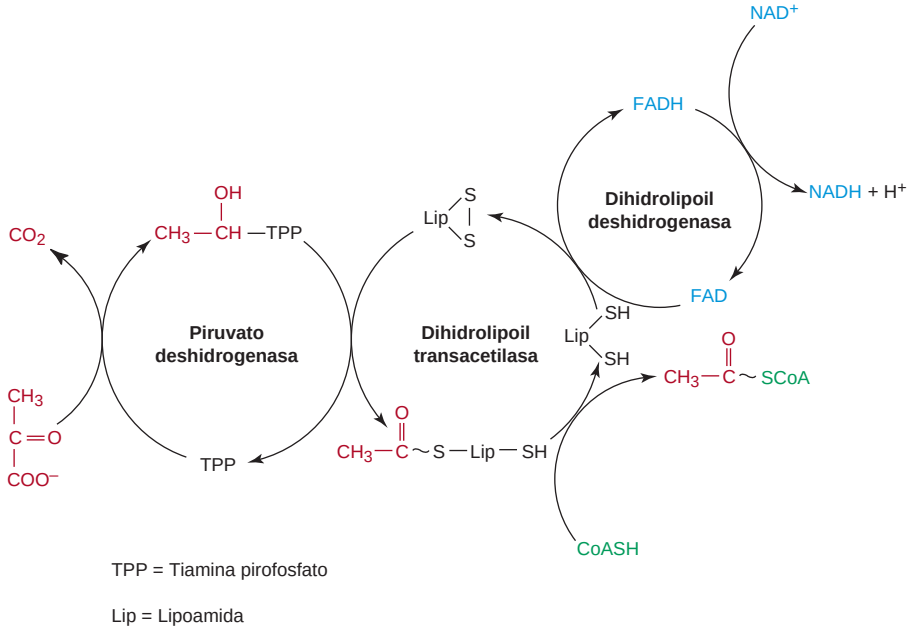


FIGURA 13.17
Mecanismo del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa.
La piruvato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato y la transferencia del grupo acetilo a la lipoamida. La dihidrolipoil transacetilasa transfiere el grupo acetilo desde la lipoamida al coenzima A. La dihidrolipoil deshidrogenasa oxida la lipoamida reducida.

hidrogenasa implica regulación por fosforilación y desfosforilación. Se han descrito dos formas del complejo de la piruvato deshidrogenasa: (1) un complejo desfosforilado activo y (2) un complejo fosforilado inactivo. La inactivación del complejo se consigue con una **proteína quinasa** dependiente de Mg^{2+}—ATP que está unida firmemente al complejo enzimático. La reactivación del complejo se logra mediante una **fosfoproteína fosfatasa**, también unida al complejo, que lo desfosforila en una reacción que es dependiente de Mg^{2+} y Ca^{2+}. La regulación diferencial de las piruvato deshidrogenasa quinasa y fosfatasa es la clave de la regulación global del complejo de la piruvato deshidrogenasa. En la Figura 13.18 se ilustran las características esenciales de este complicado sistema regulador. El acetil CoA y el NADH inhiben

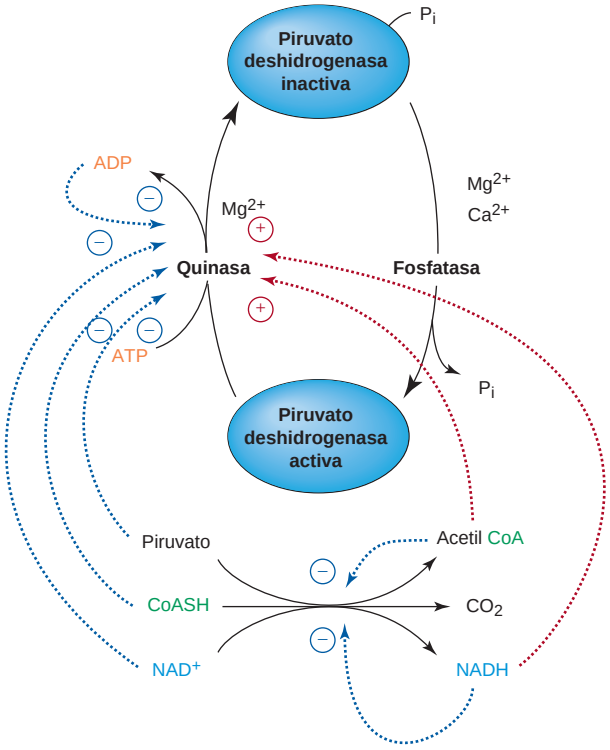
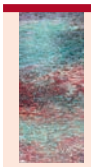


FIGURA 13.18
Regulación del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa.



APLICACIÓN CLÍNICA 13.1
Deficiencia de piruvato deshidrogenasa

Se ha detectado una serie de trastornos en el metabolismo del piruvato que afecta a niños. Algunos de estos defectos se relacionan con deficiencias en cada uno de los diferentes componentes catalíticos o subunidades reguladoras del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa. Los niños en los que se detecta un déficit de piruvato deshidrogenasa muestran habitualmente niveles séricos elevados de lactato, piruvato y alanina, lo que produce una acidosis láctica crónica. Estos pacientes muestran frecuentemente graves defectos neurológicos y, en la mayoría de los casos, acaban muriendo. El diagnóstico de la deficiencia de piruvato deshidrogenasa se hace normalmente ensayando el complejo enzimático y/o sus diversas subunidades componentes en cultivos de fibroblastos de piel extraídos del paciente. En ciertos casos, los pacientes responden a un tratamiento dietético en el que se administra una dieta cetogénica y se reducen al mínimo los glúcidos. Los pacientes pueden sufrir un shock debido a acidosis láctica porque la reducción en el aporte de O_2 a los tejidos inhibe la piruvato deshidrogenasa e incrementa el metabolismo anaeróbico. En el tratamiento de esta condición se emplea dicloroacetato, un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa quinasa. La inhibición de la quinasa, que es responsable de la inhibición del enzima, activa, por consiguiente, el complejo enzimático.

Patel, M. S. y Harris, R. A. Mammalian α-keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects. *FASEB J.* 9:1164, 1995.

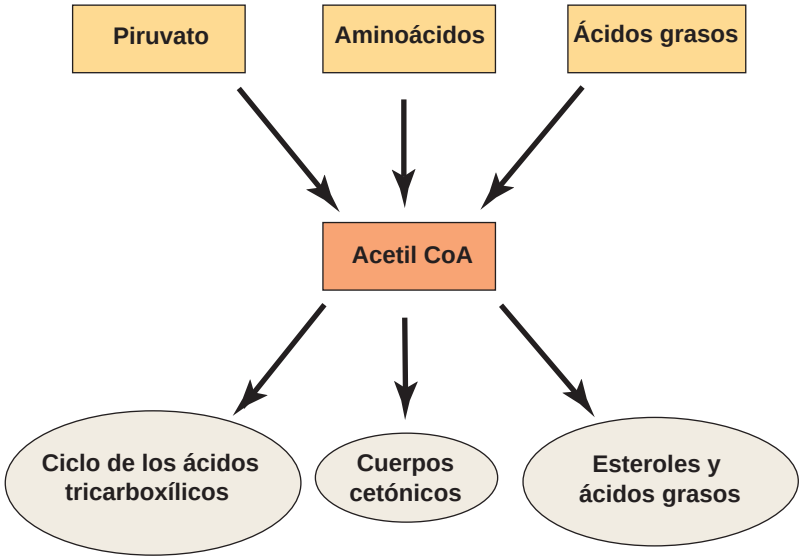


FIGURA 13.19
Fuentes y destinos del acetil CoA.

la forma desfosfo (activa) del enzima. Estos dos compuestos también estimulan la reacción de la proteína quinasa, conduciendo así a la interconversión del complejo en su forma inactiva. Además, el CoASH libre y el NAD^+ inhiben a la proteína quinasa. De aquí que cualquier incremento del cociente NADH/NAD^+ mitocondrial o de acetil CoA/CoASH, con la disminución concomitante de NAD^+ y CoASH, da como resultado la inactivación de la piruvato deshidrogenasa por activación de la reacción de la quinasa. También el sustrato del enzima, el piruvato, es un potente inhibidor de la proteína quinasa; por tanto, en presencia de niveles tisulares elevados de piruvato, se inhibe la quinasa y el complejo activo alcanza su máximo nivel. La actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa es estimulada por el Ca^{2+} que actúa como un potente activador de la reacción de la proteína fosfatasa. Estos efectos del Ca^{2+} pueden jugar un papel importante en el músculo esquelético, en el que la liberación de Ca^{2+} durante la contracción activa la proteína fosfatasa de la piruvato deshidrogenasa, estimulando así la oxidación del piruvato por este enzima y, en consecuencia, la producción de energía. Finalmente, la administración de insulina activa la piruvato deshidrogenasa en el tejido adiposo, y las catecolaminas, como la adrenalina, activan la piruvato deshidrogenasa en el tejido cardíaco. No se conocen bien los mecanismos de estos efectos hormonales, pero podrían estar implicados en alteraciones de la distribución intracelular de calcio, de modo que la reacción de la fosfoproteína fosfatasa estuviese estimulada en la matriz mitocondrial. Estos efectos hormonales no están directamente mediados por alteraciones de los niveles tisulares de cAMP, ya que las proteína quinasa y fosfatasa de la piruvato deshidrogenasa son independientes o insensibles al cAMP (véase Apli. Clín. 13.1).

El acetil CoA se utiliza en varias rutas diferentes

Los diferentes destinos del acetil CoA generado en la matriz mitocondrial incluyen (1) oxidación completa del grupo acetilo en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para la generación de energía; (2) en el hígado, la conversión de un exceso de acetil CoA en los cuerpos cetónicos acetoacetato y β-hidroxibutirato y (3) transferencia de las unidades acetilo al citosol, en forma de citrato, y posterior biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga (véase p. 698) y esteroles (Figura 13.19) (véase p. 742).

13.4 | CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS

El acetil CoA producido en las diversas vías catabólicas generadoras de energía de muchas células se oxida completamente a CO_2 en una serie cíclica de reacciones de-

nominada **ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)**. Este ciclo metabólico también se conoce comúnmente como **ciclo del ácido cítrico** o **ciclo de Krebs**, en honor de Sir Hans Krebs, que postuló las características esenciales de esta vía en 1937. Aunque algunos isozimas de los enzimas del ciclo se encuentran en el citosol, la localización primaria de los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos es la mitocondria. Este tipo de distribución es apropiada, ya que el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa y la secuencia de la β-oxidación de los ácidos grasos, las dos fuentes principales para la generación de acetil CoA, también están localizados en la mitocondria. Cuatro reacciones, implicadas en la oxidación del acetil CoA a través del ciclo TCA, transfieren electrones al NAD^+ o al FAD. El NADH + H^+ o el $FADH_2$ resultantes son, a continuación, oxidados por la **cadena de transporte electrónico** mitocondrial (también denominada **cadena de transferencia electrónica** o **cadena respiratoria**) para producir energía, es decir, ATP, en un proceso denominado fosforilación oxidativa que se discute en la p. 577. Los enzimas de la cadena de transporte electrónico así como los que intervienen en la síntesis de ATP también se encuentran localizados exclusivamente en la mitocondria. La Figura 13.20 ilustra una visión general de las reacciones del ciclo TCA. En el primer paso del ciclo TCA, la porción acetilo del acetil CoA se condensa con oxalacetato (ácido dicarboxílico de cuatro carbonos) para formar citrato (ácido tricarboxílico de seis carbonos). Después de un reordenamiento de los carbonos del citrato, dos reacciones de descarboxilación oxidativas forman dos moléculas de CO_2, dos moléculas de NADH + H^+ y succinato (ácido dicarboxílico de cuatro carbonos) con formación de un enlace de alta energía en forma de GTP. En los pasos siguientes del ciclo se dan dos reacciones más de oxidación con producción de otro NADH + H^+ más un $FADH_2$ y regeneración del oxalacetato.

En resumen, el sustrato del ciclo TCA es la unidad dicarbonada acetil CoA, y los productos de una vuelta completa del ciclo son dos CO_2, más un enlace fosfato de alta energía (en forma de GTP) y cuatro equivalentes de reducción (a saber, tres NADH y un $FADH_2$). Los NADH y el $FADH_2$ son oxidados seguidamente por la cadena de transporte electrónico con producción de 9 ATP (véase la p. 578 para el rendimiento en ATP en la oxidación de los coenzimas).

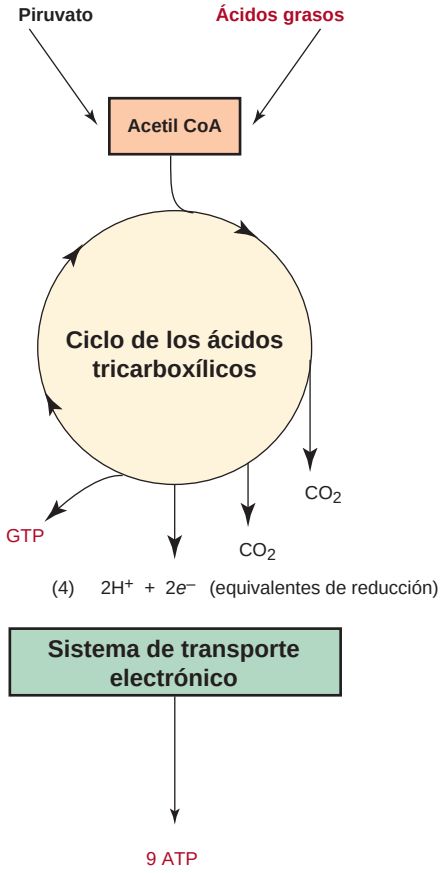
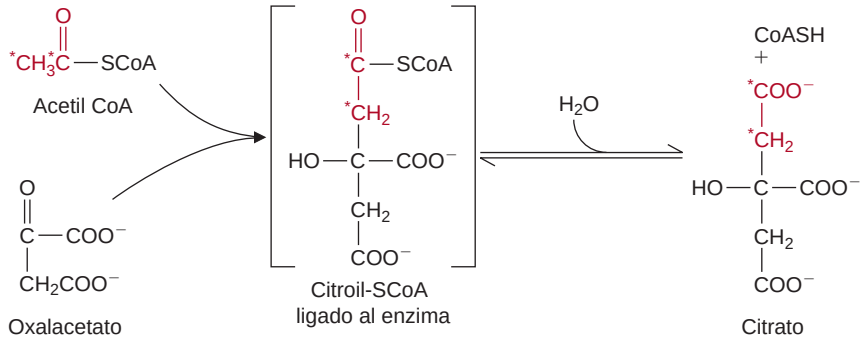


FIGURA 13.20
Descripción general de la síntesis de ATP en la mitocondria.
El acetil CoA producido por oxidación del piruvato y de los ácidos grasos se metaboliza a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos a equivalentes de reducción, que son oxidados por el sistema de transporte electrónico. La energía liberada durante el proceso oxidativo se utiliza para impulsar la síntesis de ATP.

Reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Las reacciones enzimáticas individuales del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se ilustran en la Figura 13.21. La etapa inicial del ciclo está catalizada por la **citrato sintasa**, un enzima localizado en la matriz. Esta es una reacción altamente exergónica que compromete los grupos acetilo hacia la formación de **citrato** y oxidación completa en el ciclo de Krebs. Tal como se muestra más adelante, la reacción de la citrato sintasa implica la condensación del acetilo con la función α-ceto del ácido dicarboxílico **oxalacetato**. El intermedio citroil-SCoA no se libera, sino que permanece ligado al sitio catalítico de la citrato sintasa.



CITRATO SINTASA

El equilibrio de esta reacción está muy desplazado hacia la formación de citrato con una $\Delta G^{\circ\prime}$ próxima a -9 kcal mol^{-1}. Debe notarse que la concentración intramitocondrial de oxalacetato es muy baja (menos de 1 μM); sin embargo, la $\Delta G^{\circ\prime}$ fuer-

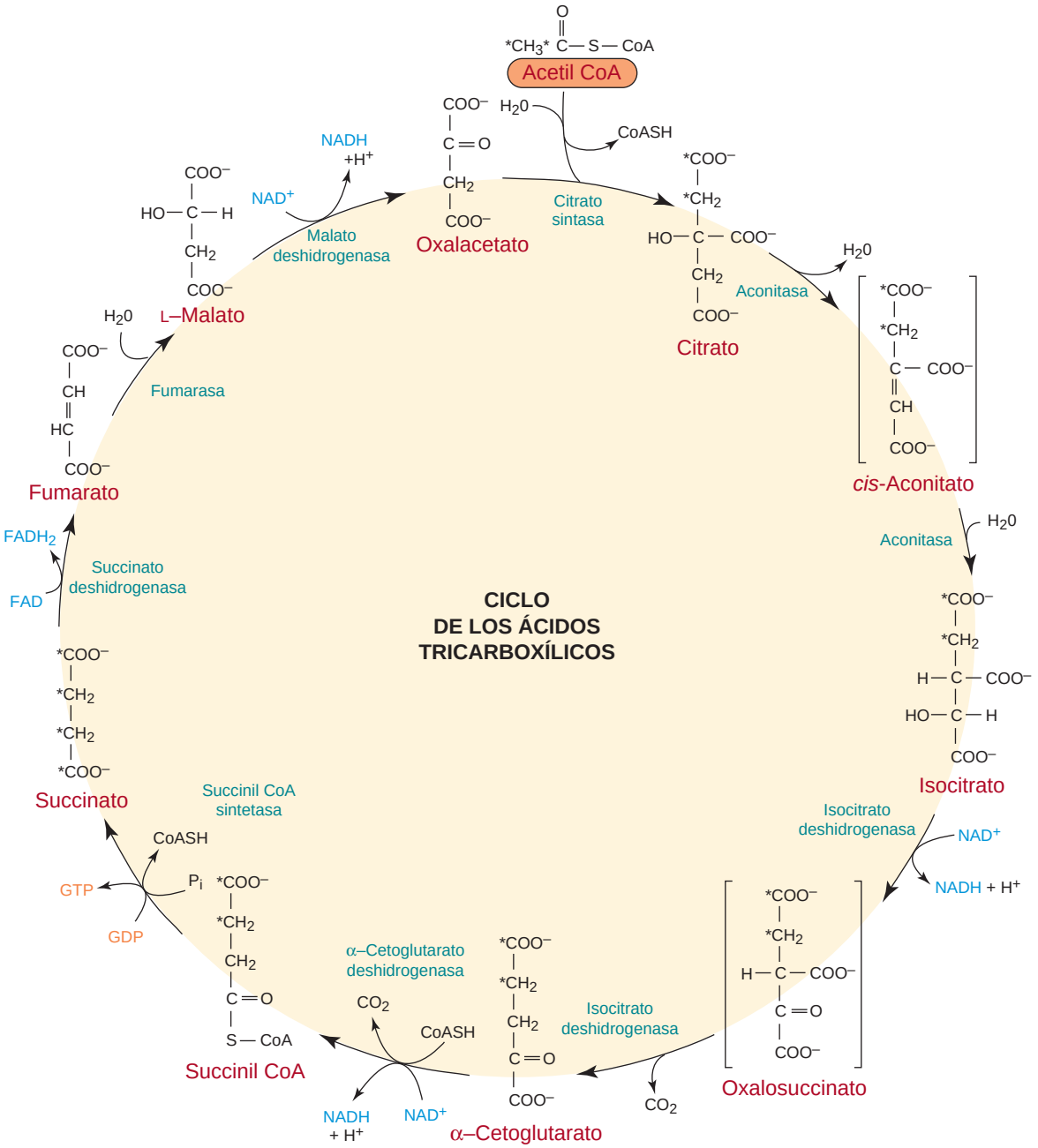
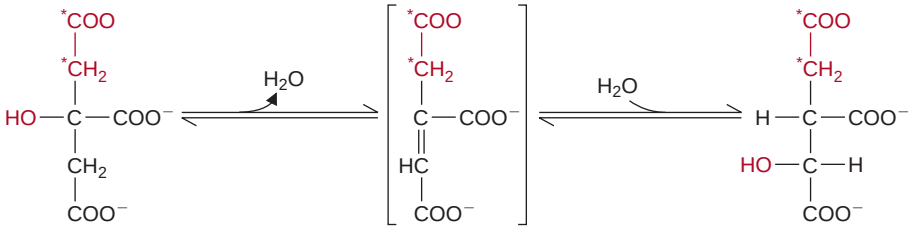


FIGURA 13.21
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
Los carbonos señalados por un asterisco indican el destino de los carbonos del grupo acetilo.

temente negativa sirve para impulsar la reacción hacia adelante. Las bajas concentraciones de oxalacetato, muy por debajo de la K_m de la reacción podrían ser también un factor importante para controlar la reacción.

El citrato se convierte en **isocitrato** en una reacción reversible catalizada por la **aconitasa** en la que el grupo hidroxilo del citrato se transfiere a un carbono adyacente con un enlace C—H. El grupo hidroxilo está así localizado próximo al grupo carboxilo del isocitrato, en donde puede tener lugar la descarboxilación oxidativa. La conversión del citrato en isocitrato tiene lugar en la superficie del enzima aconitasa sin que se libere el supuesto intermediario ***cis*-aconitato**. La aconitasa contiene un agrupamiento ferrosulfurado no hemo que está implicado en el

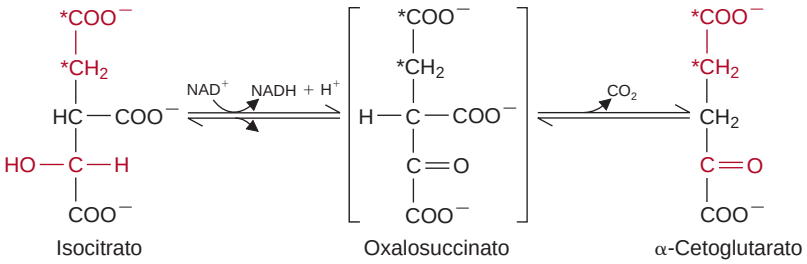
mecanismo catalítico. El equilibrio global de la reacción favorece la formación de citrato:



ACONITASA

El **fluoroacetato** es un potente inhibidor del ciclo aunque no inhibe directamente ninguno de los enzimas del ciclo. El mecanismo de inhibición se explica por la observación que el fluroacetato se convierte en dos pasos en fluorocitrato, que es un potente inhibidor de la aconitasa. El fluoroacetil CoA se forma por acción de la acetil CoA sintetasa. A continuación la citrato sintasa convierte el fluoroacetil CoA en fluorocitrato. El fluoroacetato es letal a pequeñas dosis y se ha utilizado como raticida; la LD_{50}, la dosis letal para el 50% de los animales que lo consumen, es 0,2 mg por kilo de peso corporal.

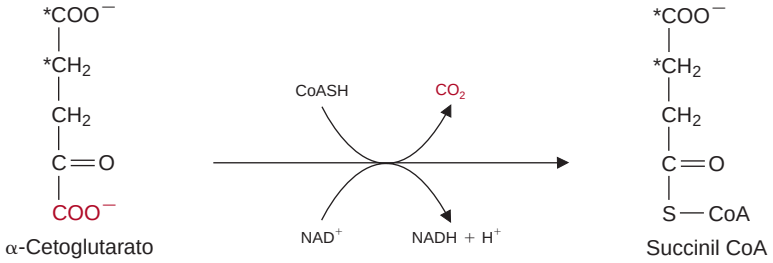
En el paso siguiente del ciclo TCA, la **isocitrato deshidrogenasa** convierte el isocitrato en **α-**cetoglutarato en una reacción de descarboxilación oxidativa con la reducción concomitante del NAD^+ a NADH + H^+. La isocitrato deshidrogenasa presente en la mitocondria de mamíferos requiere NAD^+ como aceptor de los equivalentes de reducción, tiene una masa molecular relativa de 380 000 y consta de ocho subunidades idénticas. La reacción requiere un catión metálico divalente (p. ej., Mn^{2+} o Mg^{2+}) en la descarboxilación de la posición **β** del oxalosuccinato. El equilibrio de esta reacción está fuertemente desplazado hacia la formación de **α-**cetoglutarato y tiene una $\Delta G°'$ de casi -5 kcal mol^{-1}.



ISOCITRATO DESHIDROGENASA

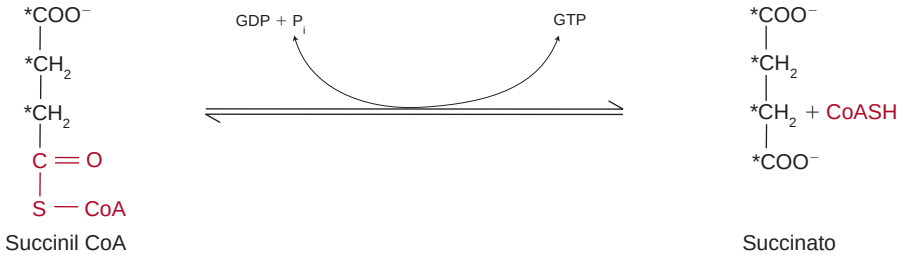
Las mitocondrias poseen también una isocitrato deshidrogenasa que requiere $NADP^+$. El enzima ligado al $NADP^+$ también se encuentra en el citosol, donde está implicado en la tarea de proporcionar equivalentes de reducción a procesos reductores citosólicos.

La conversión del **α**-cetoglutarato en succinil CoA está catalizada por el complejo multienzimático de la **α-cetoglutarato deshidrogenasa**, complejo multienzimático casi idéntico al de la piruvato deshidrogenasa en lo concerniente a las reacciones individuales catalizadas y a sus características estructurales. Aquí también la **tiamina pirofosfato**, **ácido lipoico**, CoASH, **FAD** y NAD^+ participan en el mecanismo catalítico. El complejo multienzimático consta de la **α**-cetoglutarato deshidrogenasa, de la **dihidrolipoil transsuccinilasa** y de la dihidrolipoil deshidrogenasa, que constituyen las tres subunidades catalíticas. Con una $\Delta G°'$ de -8 kcal mol^{-1}, el equilibrio de la **α**-cetoglutarato deshidrogenasa está fuertemente desplazado hacia la formación de succinil CoA. En esta reacción se producen la segunda molécula de CO_2 y el segundo equivalente de reducción (a saber, NADH + H^+) del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Otro producto de esta reacción, el **succinil CoA**, es un compuesto tioéster de alta energía similar al acetil CoA.



α-CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA

El carácter de alto contenido energético del enlace tioéster del succinil CoA se conserva en una reacción de **fosforilación a nivel de sustrato** en el paso siguiente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La **succinil CoA sintetasa** (o **succinato tioquinasa**) convierte el succinil CoA en succinato, e implica en los tejidos de mamíferos la fosforilación de GDP a GTP.



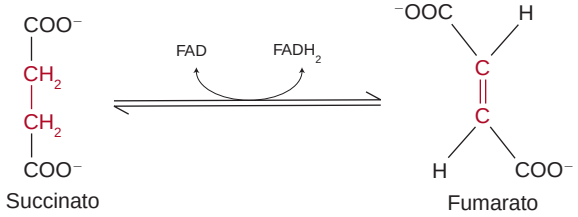
SUCCINIL CoA SINTETASA

Esta reacción es fácilmente reversible con una $\Delta G^{\circ\prime} = -0{,}7$ kcal mol^{-1}, y el mecanismo catalítico implica un intermediario enzima–succinil fosfato:

$$\text{succinil CoA} + P_i + \text{enz} \rightleftharpoons \text{enz–succinil fosfato} + \text{CoASH}$$
$$\text{enz–succinil fosfato} \rightleftharpoons \text{enz–fosfato} + \text{succinato}$$
$$\text{enz–fosfato} + \text{GDP} \rightleftharpoons \text{enz} + \text{GTP}$$

El enzima se fosforila en la posición 3 de un residuo de histidina que conserva la energía del tioéster en forma de GTP. La presencia de la nucleósido difosfato quinasa proporciona el mecanismo para la transferencia del γ-fosfato del GTP al ADP para generar ATP (Figura 13.10).

El succinato se oxida a fumarato en la reacción de la **succinato deshidrogenasa**, un enzima complejo que se halla estrechamente unido a la membrana interna mitocondrial. La succinato deshidrogenasa está compuesta por cuatro subunidades, una con masa molecular relativa de 70 000 contiene el sitio de fijación de sustrato (FAD unido covalentemente a un residuo de histidina) y una de masa molecular relativa 30 000 que contiene tres **centros ferrosulfurados (hierro no hemo)** más dos proteínas hidrofóbicas pequeñas. Este enzima es un ejemplo típico de flavoproteína en la que electrones y protones se transfieren desde el sustrato, el succinato, a través del FAD unido covalentemente y los centros ferrosulfurados en los que el hierro no hemo experimenta oxidación y reducción. Los electrones se transfieren finalmente al coenzima Q para, a continuación, ser transportados por la cadena de transferencia electrónica tal como se discutirá en la Sección 13.6 (véase p. 564). La succinato deshidrogenasa es fuertemente inhibida por el malonato y el oxalacetato, y es activada por el ATP, P_i y succinato. El malonato inhibe a la succinato deshidrogenasa en forma competitiva con respecto al succinato debido al gran parecido estructural entre el malonato y el succinato (Figura 13.22).



SUCCINATO DESHIDROGENASA

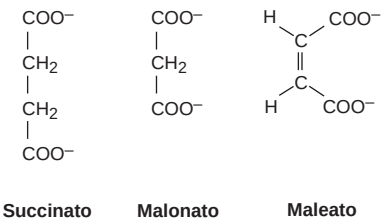
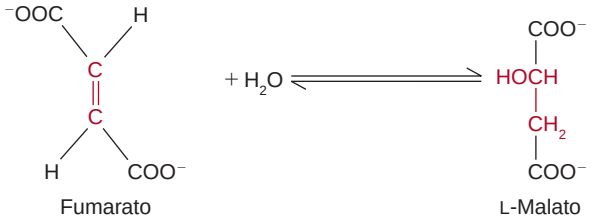


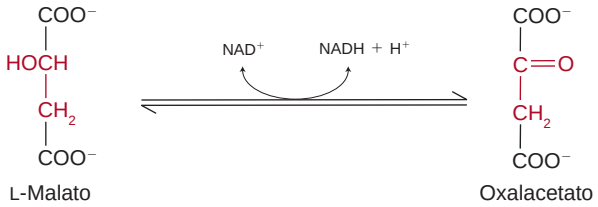
FIGURA 13.22
Estructuras del succinato, intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; malonato, inhibidor de la succinato deshidrogenasa y del ciclo; y maleato, compuesto que no interviene en el ciclo.

El fumarato se hidrata a continuación formando L-malato mediante el enzima fumarasa. La **fumarasa** es un tetrámero con una masa molecular relativa de 200 000 y es estereoespecífica para la forma *trans* del sustrato (es decir, la forma *cis*, maleato, no es sustrato; Figura 13.22). En condiciones fisiológicas, la reacción de la fumarasa es fácilmente reversible. La Apli. Clín. 13.2 describe un defecto genético de la fumarasa.



FUMARASA

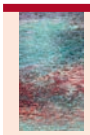
La reacción final del ciclo TCA es la reacción catalizada por la **malato deshidrogenasa**, en la que se transfieren los equivalentes de reducción al NAD^+ para formar NADH + H^+. Con $\Delta G^{\circ\prime} = +7{,}0$ kcal mol^{-1}, el equilibrio de la reacción de la malato deshidrogenasa, tal como está escrita, está muy desplazado hacia la formación de L-malato. Esta reacción endergónica es impulsada por las acciones de la citrato sintasa y otras reacciones del ciclo que eliminan el oxalacetato. Además de ello, el NADH formado en las tres deshidrogenasas del ciclo ligadas a NAD^+ se oxida rápidamente a NAD^+ en la cadena respiratoria mitocondrial, lo que constituye otro factor que favorece la dirección hacia adelante de la malato deshidrogenasa.



MALATO DESHIDROGENASA

La conversión del grupo acetilo del acetil CoA en CO_2 y H_2O conserva energía

En resumen, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 13.20) sirve de ruta oxidativa terminal de la mayoría de los combustibles metabólicos. Grupos de dos carbonos en forma de acetil CoA se oxidan completamente a CO_2 y H_2O. Durante el proceso se forman cuatro equivalentes de reducción (3 en forma de NADH + H^+ y 1 en forma de $FADH_2$), que se utilizan seguidamente para la generación de energía. La oxidación de cada NADH + H^+ da lugar a la formación de 2,5 moléculas de ATP en la fosforilación oxidativa, mientras que la oxidación del $FADH_2$ formado



APLICACIÓN CLÍNICA 13.2
Deficiencia de fumarasa

La deficiencia de enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos es poco frecuente. Esto indica la importancia de esta ruta para sobrevivir. No obstante, se han registrado algunos casos en los que hay una deficiencia grave de fumarasa tanto en las mitocondrias como en el citosol de los tejidos (p. ej., linfocitos de la sangre). La enfermedad se caracteriza por graves lesiones neurológicas, encefalomiopatía y distonía que se manifiestan poco después del nacimiento. La orina contiene niveles anormales de fumarato y niveles elevados de succinato, α-cetoglutarato, citrato y malato. Ambos enzimas, mitocondrial y citosólico, proceden de un único gen. Los dos padres de los pacientes con deficiencia de fumarasa presentan la mitad de la actividad enzimática normal, pero son clínicamente normales, como se corresponde con un trastorno autosómico recesivo. La primera descripción de una mutación en el gen indicó que el glutamato-319 estaba sustituido por una glutamina.

Bourgeron, T., Chretien, D., Poggi-Bach, J., et al. Mutation of the fumarase gene in two siblings with progressive encephalopathy and fumarase deficiency. *J. Clin. Invest.* 93:2514, 1994.

en la reacción de la succinato deshidrogenasa produce 1,5 moléculas de ATP. En la reacción de la succinil CoA sintetasa también se genera un enlace de alto contenido energético en forma de GTP. De ahí que el rendimiento neto de ATP o su equivalente (a saber, GTP) para la oxidación completa de un grupo acetilo en el ciclo de Krebs sea de 10.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos sirve de fuente de intermediarios biosintéticos

Hasta el momento la discusión del ciclo TCA se ha centrado en su papel catabólico en la degradación oxidativa del acetato a CO_2 y H_2O con formación de coenzimas reducidos y síntesis de ATP. En general, el ciclo TCA sirve como paso final en la degradación de los alimentos; sin embargo, tal como se resume en la Figura 13.23, los compuestos de cuatro, cinco y seis carbonos generados en las reacciones del ciclo TCA son intermedios importantes en **procesos biosintéticos**. Succinil CoA, oxalacetato, α-cetoglutarato, malato y citrato son todos ellos precursores de compuestos celulares importantes.

La **transaminación** convierte el α-cetoglutarato en el aminoácido glutamato, el cual puede salir de la mitocondria y actuar como precursor de otros aminoácidos. En el tejido nervioso el α-cetoglutarato se convierte en los neurotransmisores glutamato y ácido γ-aminobutírico (GABA). El glutamato también se forma a partir del α-cetoglutarato por acción del enzima mitocondrial glutamato deshidrogenasa en presencia de NADH, o NADPH, y amoníaco. El grupo amino incorporado en el glutamato puede ser transferido a diversos aminoácidos mediante diferentes transaminasas. En el Capítulo 18 se discuten estos enzimas y la importancia de la incorporación y liberación de amoníaco en o a partir de α-cetoácidos. El compuesto de cuatro carbonos succinil CoA representa un punto de ramificación metabólica en el que pueden entrar o salir intermediarios del ciclo TCA (Figura 13.24). El succinil CoA se puede formar a partir del α-cetoglutarato en el ciclo o a partir del metilmalonil CoA en los pasos finales de la degradación de ácidos grasos de cadena impar o de los aminoácidos ramificados valina e isoleucina. Entre los destinos metabólicos del succinil CoA se cuentan su conversión a succinato en la reacción de la succinil CoA sintetasa del ciclo de Krebs y su condensación con glicina para formar δ-aminolevulinato por la δ-aminolevulinato sintasa, que es la reacción inicial de la biosíntesis de porfirinas (véase p. 1065).

El oxalacetato se transamina a aspartato, que es un intermediario clave en la biosíntesis de otros aminoácidos. El oxalacetato se convierte en **fosfo*enol*piruvato (PEP)** intermediario clave en la síntesis de glucosa a través de la **gluconeogénesis** (véase p. 631). El oxalacetato no puede atravesar la membrana mitocondrial, por lo que se convierte primero en malato, el cual es transportado mediante un transportador específico fuera de la mitocondria en donde se reoxida para regenerar el oxalacetato, que a continuación se convierte en PEP (véase p. 631).

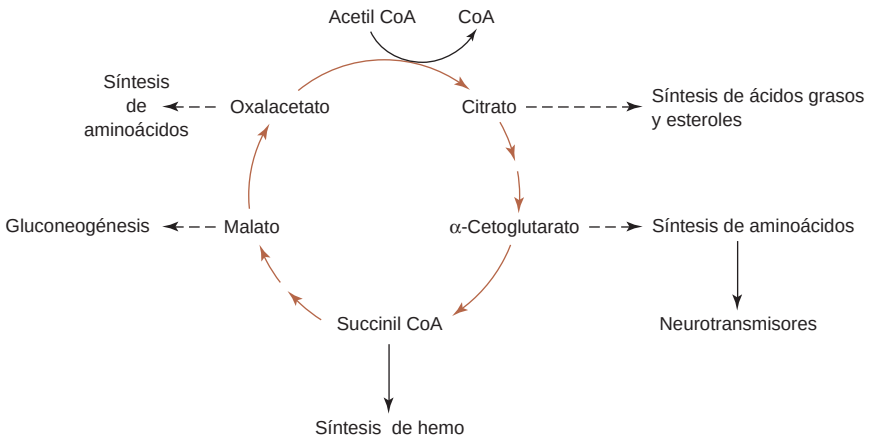


FIGURA 13.23
El ciclo TCA sirve como fuente de precursores para la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos y glucosa.

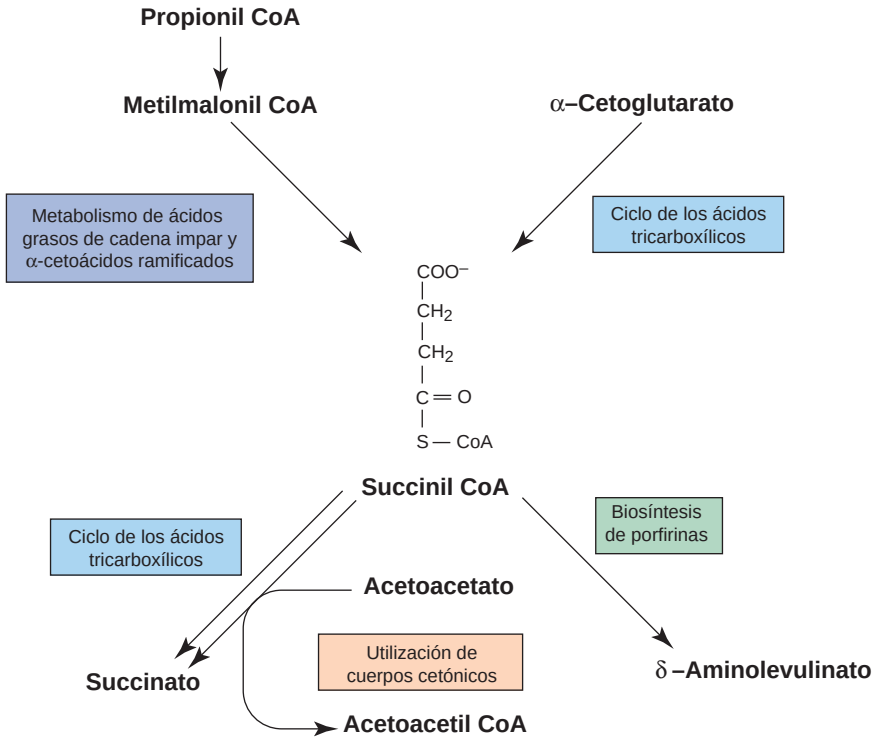


FIGURA 13.24
Fuentes y destinos del succinil CoA.

Finalmente, el citrato se exporta de la mitocondria al citosol. La **citrato liasa** lo convierte en oxalacetato y acetil CoA, que es un precursor de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga y de los esteroles. El oxalacetato producido en esta reacción es reducido rápidamente a malato que es convertido, por acción del **enzima málico**, en piruvato y NADPH, una fuente de equivalentes de reducción para procesos biosintéticos en el citosol. El citrato sirve, además, como efector regulador de otras rutas metabólicas (véase Capítulos 14 y 16).

Las reacciones anapleróticas restablecen los intermediarios de ciclo de los ácidos tricarboxílicos

En su papel dentro del catabolismo, el ciclo TCA oxida acetil CoA liberando dos carbonos del acetato en forma de CO_2 sin pérdida concomitante de los carbonos de los ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos succinato, fumarato, malato y oxalacetato. Por supuesto que el oxalacetato, aceptor del grupo acetato, se regenera durante el ciclo. Sin embargo, las rutas metabólicas que actúan en todos los tejidos eliminan intermediarios del ciclo TCA para utilizarlos en las vías biosintéticas. De ahí que, para mantener un ciclo TCA funcional, se requiera una fuente de ácidos de cuatro carbonos para reponer el oxalacetato perdido. Las reacciones que proporcionan intermediarios de cuatro o cinco carbonos al ciclo se denominan **reacciones anapleróticas** (que significa "reponer" o "rellenar") (Figura 13.25). La más importante es la catalizada por la **piruvato carboxilasa**, que cataliza la conversión de piruvato y CO_2 en oxalacetato (Figura 13.26). El enzima contiene un cofactor unido de forma covalente, la biotina, que liga el CO_2 en presencia de iones Mg^{2+} y ATP. El grupo CO_2 se transfiere seguidamente al piruvato en forma de grupo carboxilo (véase p. 731). Tanto el hígado como los tejidos nerviosos poseen niveles elevados de piruvato carboxilasa, ya que estos tejidos están sometidos a una pérdida constante de intermediarios utilizados para la gluconeogénesis en el hígado y para la síntesis de neurotransmisores en los tejidos nerviosos.

Los aminoácidos también sirven de fuente de intermediarios de cuatro carbonos. El glutamato se convierte en α-cetoglutarato en la mitocondria por acción de la glutamato deshidrogenasa. El aspartato se convierte en oxalacetato por transaminación, mientras que la valina y la isoleucina se degradan a propionil CoA que en-

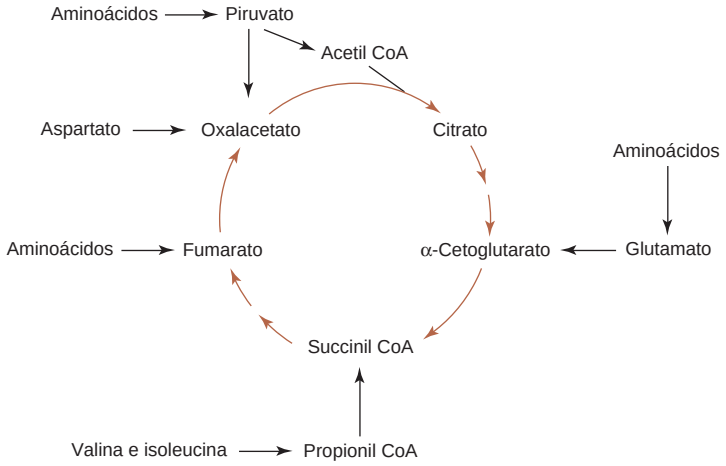


FIGURA 13.25
Las reacciones anapleróticas reponen los intermediarios del ciclo TCA.

tra al ciclo TCA en forma de succinil CoA. Los aminoácidos que provienen de la degradación del músculo se convierten en una fuente importante de ácidos de cuatro carbonos que son sustratos para la gluconeogénesis durante el ayuno (véase Capítulo 14).

La actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos está cuidadosamente regulada

En la regulación de la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos están implicados diversos factores. Primero, el suministro de unidades de acetilo, tanto si provienen del piruvato (es decir, de glúcidos) como de ácidos grasos, es un factor crucial para determinar la velocidad del ciclo. La regulación de la piruvato deshidrogenasa tienen un efecto importante sobre la actividad del ciclo. De igual modo, cualquier control ejercido sobre los procesos de transporte de ácidos grasos a la mitocondria y sobre la β-oxidación de los mismos constituye un determinante efectivo sobre la actividad del ciclo. Segundo, dado que las deshidrogenasas del ciclo dependen de un suministro continuo de NAD^+ y FAD, sus actividades están controladas muy estrictamente por la cadena respiratoria mitocondrial, que es responsable de la oxidación del NADH y del $FADH_2$. Tal como se discute en la sección 13.7 (véase p. 577), la actividad de la cadena respiratoria está obligatoriamente ligada a la generación de ATP en la secuencia de reacciones de la fosforilación oxidativa, proceso denominado **control respiratorio**. En consecuencia, la actividad del ciclo TCA depende en gran manera de la síntesis de ATP (y, en consecuencia, de la velocidad del transporte de electrones), el cual está fuertemente afectado por la asequibilidad de ADP, fosfato y oxígeno. Así, cualquier agente inhibidor o condición metabólica que pueda interrumpir el suministro de oxígeno, el aporte continuo de ADP o la fuente de equivalentes de reducción (p. ej., sustratos para el ciclo) disminuirá la actividad del ciclo. En general, este tipo de control del ciclo se conoce como "control grosero" del ciclo. Se han postulado toda una serie de interacciones reguladoras entre diversos intermediarios o nucleótidos y los enzimas individuales del ciclo, que podrían ejercer un control más fino sobre la actividad de dicho ciclo. En la Figura 13.27 se muestran algunas de estas interacciones. Debe resaltarse que no se ha establecido de forma absoluta la relación fisiológica de gran parte de estos tipos de interacciones reguladoras concretas en los sistemas metabólicos intactos.

La citrato sintasa purificada es inhibida por el ATP, NADH, succinil CoA y derivados acil CoA de cadena larga; sin embargo, estos efectos no se han demostrado en sistemas metabólicos intactos en condiciones fisiológicas. El medio más probable para la regulación de la reacción de la citrato sintasa es la disponibilidad de sus dos sustratos, acetil CoA y oxalacetato. Tal como se ha discutido anteriormente, en las mitocondrias se encuentran concentraciones muy bajas de oxalacetato (inferiores a la K_m de la citrato sintasa para el oxalacetato).

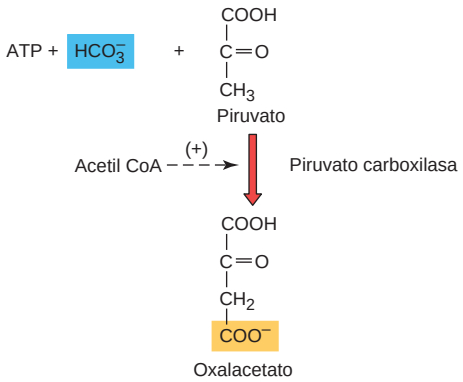


FIGURA 13.26
Reacción de la piruvato carboxilasa.

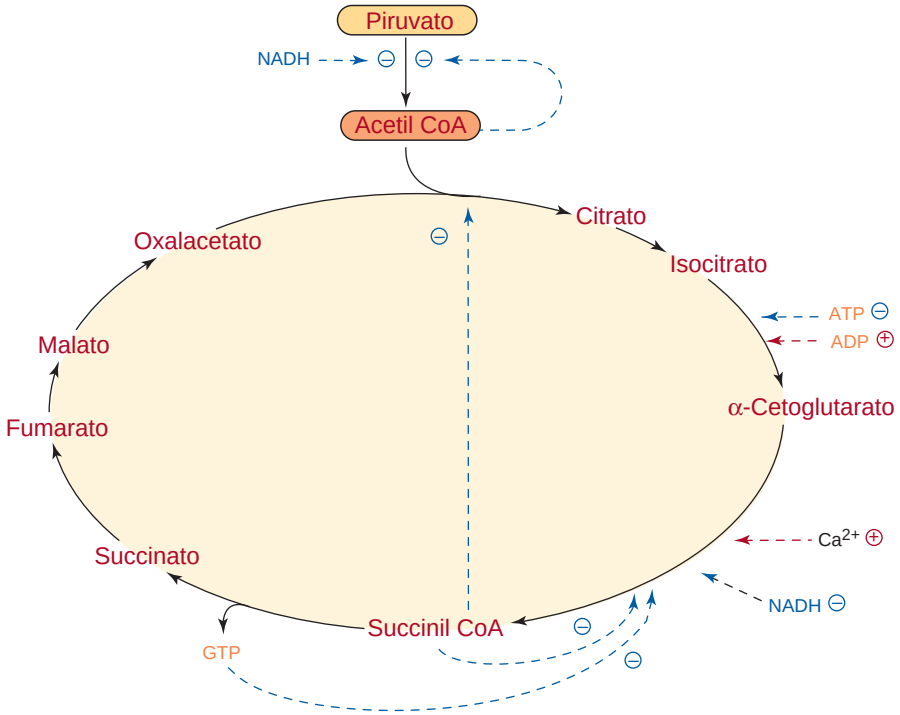


FIGURA 13.27
Ejemplos representativos de interacciones reguladoras en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

La isocitrato deshidrogenasa ligada a NAD^+, a menudo considerada como el enzima regulador clave del ciclo TCA, es estimulada por el ADP y, en algunos casos AMP, y es inhibida por el ATP y el NADH. Por tanto, en condiciones de elevada energía (es decir, elevadas razones ATP/ADP + P_i y NADH/NAD^+), se inhibe la actividad de la isocitrato deshidrogenasa ligada a NAD^+ del ciclo TCA. Por el contrario, durante períodos de baja energía se estimula la actividad de este enzima y, por consiguiente, la de todo el ciclo. De este modo, el control respiratorio por la cadena de transporte electrónico acoplada a la síntesis de ATP actúa regulando el ciclo TCA en el paso de la isocitrato deshidrogenasa ligada a NAD^+ al afectar los niveles de ADP y NAD^+ necesarios para activar o inhibir el enzima.

El otro enzima irreversible del ciclo TCA, el complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa, es inhibido tanto por ATP como GTP, NADH y succinil CoA, mientras que se ha demostrado que el Ca^{2+} activa el complejo en ciertos tejidos. A diferencia del complejo de la piruvato deshidrogenasa, la α-cetoglutarato deshidrogenasa no es regulada por fosforilación mediante una proteína quinasa.

13.5 ESTRUCTURA Y COMPARTIMENTACIÓN MEDIANTE LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES

Las etapas finales de degradación de los glúcidos y de los ácidos grasos están localizadas en las **mitocondrias** en donde la energía liberada durante la oxidación de NADH y $FADH_2$ se transduce en energía química del ATP. Este proceso se denomina fosforilación oxidativa y a las mitocondrias se las denomina a menudo **"central energética de la célula"**. El número y actividad de las mitocondrias en los diferentes tejidos (véase Figura 13.28) reflejan la función fisiológica del tejido y determinan su capacidad para llevar a cabo funciones metabólicas aeróbicas. El músculo cardíaco es muy aeróbico y necesita un aporte constante de ATP. Se ha calculado que alrededor de la mitad del volumen citoplasmático de las células cardíacas está compuesto por mitocondrias que tienen un gran número de pliegues en su membrana interna, denominados **crestas**, y, por consiguiente, tienen una gran concentración de los complejos enzimáticos de la cadena de transporte electrónico. El hígado es también muy dependiente de los procesos metabólicos aeróbicos para poder desarrollar sus

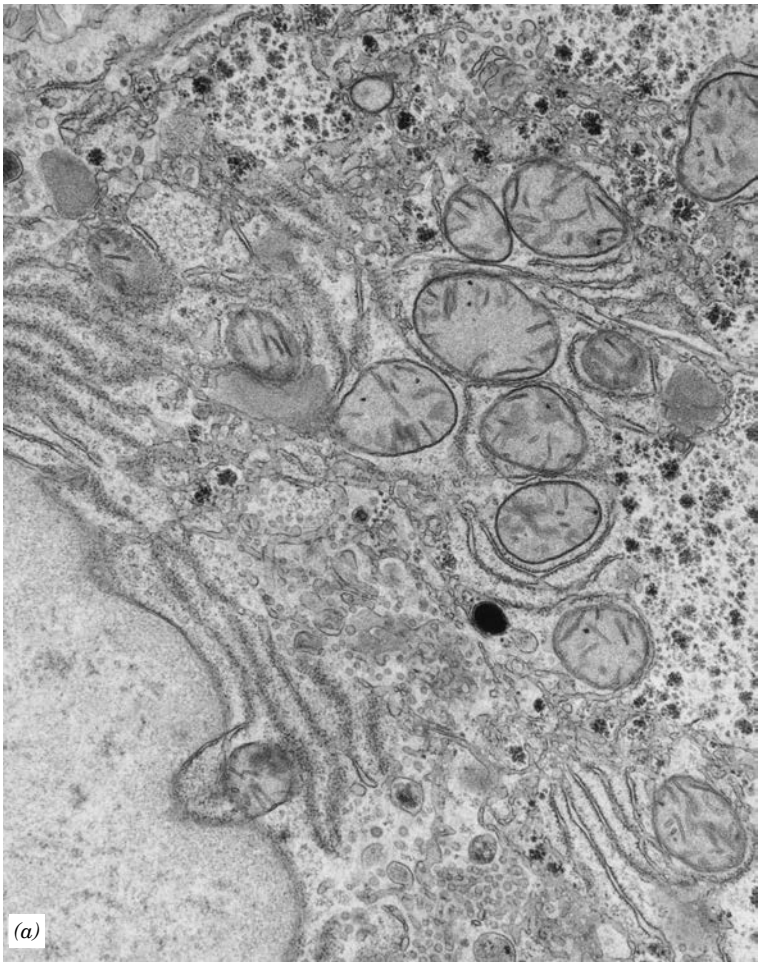


FIGURA 13.28
Micrografías electrónicas de mitocondrias (*a*) en hepatocitos de hígado de rata (× 39 600) y (*b*) en fibras musculares de corazón de conejo (× 39 600).
Cortesía del Dr. W. B. Winborn, Department of Anatomy, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, and the Electron Microscopy Laboratory, Department of Pathology, The University of Texas Health Science Center at San Antonio.

diversas funciones; se ha calculado que los hepatocitos de mamífero contienen entre 800 y 2000 mitocondrias. Por el contrario, los eritrocitos no tienen mitocondrias y no poseen la capacidad de generar energía utilizando O_2 como aceptor electrónico final; en lugar de ello, obtienen su energía a partir de la glucólisis. Las mitocondrias adoptan diferentes formas, según el tipo de célula del que se obtienen. Tal como puede verse en la Figura 13.28, las mitocondrias del hígado son de forma casi esférica, mientras que las que se encuentran en el músculo cardíaco son de forma oblonga o cilíndrica y contienen muchas más crestas que las mitocondrias hepáticas.

Las membranas mitocondriales interna y externa tienen diferente composición y función

Las mitocondrias tienen dos membranas, una **membrana externa** y una **membrana interna**. Esta última es estructural y funcionalmente muy compleja (véase Figura 13.29). El espacio entre estas membranas es el **espacio intermembrana.** Diversos enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP, tales como la adenilato quinasa, la creatina quinasa y la nucleósido difosfato quinasa se encuentran en el espacio intermembrana (véase Tabla 13.5). La membrana externa está compuesta por un 30 a 40% de lípidos y un 60 a 70% de proteínas, con relativamente pocas funciones enzimáticas o de transporte. La membrana externa es rica en una proteína denominada **porina**, una proteína que se extiende de una lado a otro de la membrana y que está compuesta por hojas β que forman un canal que permite el movimiento de moléculas con masas moleculares relativas de hasta 10 000 a través de la membrana. Además, la monoamino oxidasa y la quinurenina hidroxilasa, enzimas importantes en el sistema nervioso para la eliminación de neurotransmisores, están localizadas en la superficie exterior de la membrana externa.

La membrana interna, una membrana compleja, contiene un 80% de proteína y es rica en ácidos grasos insaturados. Además, en esta membrana se encuentran presentes **cardiolipina** y difosfatidilglicerol a elevadas concentraciones. Los complejos enzimáticos implicados en el transporte electrónico y en la fosforilación oxidativa están localizados en la membrana interna, así como diversas deshidrogenasas y sistemas de transporte, los cuales están implicados en la transferencia de sustratos, intermediarios metabólicos y nucleótidos de adenina entre el citosol y la matriz. La membrana aparece invaginada formando pliegues denominados **crestas** que incrementan el área superficial (véase Figura 13.29). El espacio que se encuentra dentro de la membrana interna, denominado **matriz**, contiene los enzimas del ciclo TCA a excepción de la succinato deshidrogenasa, que está unida a la membrana interna, y los enzimas para la oxidación de los ácidos grasos. Además, en la matriz se localizan el DNA mitocondrial (mtDNA), ribosomas y las proteínas necesarias para la transcripción del mtDNA y para la traducción del mRNA.

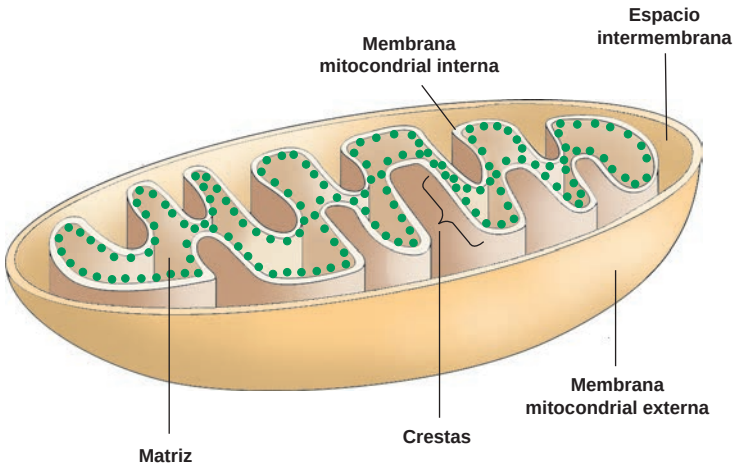


FIGURA 13.29
Diagrama de los diferentes compartimientos submitocondriales.
Las esferas verdes representan la localización de la porción F_1 de la ATP sintasa en la membrana mitocondrial interna.

TABLA 13.5 Composición enzimática de los diversos subcompartimientos mitocondriales

Membrana externa	*Espacio intermembrana*	*Membrana interna*	*Matriz*
Monoamino oxidasa	Adenilato quinasa	Succinato deshidrogenasa	Piruvato deshidrogenasa
Quinurenina hidroxilasa	Nucleósido difosfato quinasa	F_1F_o ATPasa	Citrato sintasa
Nucleósido difosfato quinasa	Creatina quinasa	NADH deshidrogenasa	Isocitrato deshidrogenasa
Fosfolipasa A		β-Hidroxibutirato deshidrogenasa	α-Cetoglutarato deshidrogenasa
Acil graso CoA sintetasas		Citocromo b, c_1, c, a, a_3	Aconitasa
NADH: citocromo c reductasa (insensible a la rotenona)		Carnitina: acil CoA transferasa	Fumarasa
			Succinil CoA sintetasa
Colina fosfotransferasa		Translocasa de nucleótidos de adenina	Malato deshidrogenasa
		Translocasa de mono-, di- y tricarboxilatos	Sistema de β-oxidación de ácidos grasos
			Glutamato deshidrogenasa
		Translocasa de glutamato–aspartato	Glutamato–oxalacetato transaminasa
		Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa	Ornitina transcarbamilasa
			Carbamil fosfato sintetasa I
			Enzimas de la síntesis del hemo

13.6 CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO

Durante las reacciones implicadas en la oxidación de los ácidos grasos y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se producen equivalentes de reducción en la degradación y oxidación secuencial de los sustratos. Los equivalentes de reducción se transfieren al NADH y al $FADH_2$, que a continuación se oxidan a través de la **cadena de transporte electrónico**, un sistema de transportadores de electrones situado en la membrana interna. En presencia de O_2, este sistema convierte equivalentes de reducción en energía utilizable, en forma de ATP, mediante el proceso de la fosforilación oxidativa. La oxidación completa de NADH y $FADH_2$ por la cadena de transporte electrónico da lugar a la producción de aproximadamente 2,5 y 1,5 moles de ATP por mol de equivalente de reducción transferido al oxígeno, respectivamente.

Reacciones de oxidación–reducción

El sistema de transporte electrónico mitocondrial es poco más que una secuencia de reacciones de oxidación–reducción ligadas. Las reacciones de oxidación–reducción tienen lugar cuando se produce una transferencia de electrones desde un dador electrónico adecuado (el **reductor**) a un aceptor electrónico conveniente (el **oxidante**). En algunas reacciones de oxidación–reducción sólo se transfieren electrones desde el reductor al oxidante (p. ej., transferencia de electrones entre citocromos),

$$\text{citocromo } c\ (Fe^{2+}) + \text{citocromo } a\ (Fe^{3+}) \rightleftharpoons \text{citocromo } c\ (Fe^{3+}) + \text{citocromo } a\ (Fe^{2+})$$

mientras que en otros tipos de reacción se transfieren tanto electrones como protones (átomos de hidrógeno) (p. ej., transferencia electrónica entre NADH y FAD).

$$NADH + H^+ + FAD \rightleftharpoons NAD^+ + FADH_2$$

Las formas oxidada y reducida de los compuestos o grupos que operan en las reacciones de oxidación–reducción se denominan **pares redox**. La facilidad con la que un dador electrónico determinado (reductor) cede sus electrones a un aceptor electrónico (oxidante) se expresa cuantitativamente como **potencial de oxidación–reducción** del sistema. El potencial de oxidación–reducción se mide en voltios como la **fuerza electromotriz** (fem) de una semicélula constituida por ambos componentes de un par redox comparada con una semicélula de referencia (habitualmente la reacción del electrodo de hidrógeno). El potencial del electrodo de referencia de hidrógeno se sitúa por convención en 0,0 V a pH 0,0. Sin embargo, en sistemas biológicos en los que el pH es 7,0, el potencial del electrodo de referencia se convierte en −0,42 V. En la Tabla 13.6 se indican los potenciales de oxidación–reducción de una serie de reacciones bioquímicas importantes. Para interpretar los datos de la tabla recuerde que el reductor de un par de oxidación–reducción con un potencial muy negativo cede

TABLA 13.6 Potenciales de oxidación–reducción estándar de diversas reacciones bioquímicas

Sistema de oxidación–reducción	*Potencial de oxidación–reducción estándar* E_0' *(V)*
Acetato + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ acetaldehído	−0,60
$2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$	−0,42
Acetoacetato + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ β-hidroxibutirato	−0,35
$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH + H^+$	−0,32
Acetaldehído + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ etanol	−0,20
Piruvato + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ lactato	−0,19
Oxalacetato + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ malato	−0,17
Coenzima $Q_{ox} + 2e^- \rightleftharpoons$ coenzima Q_{red}	+0,10
Citocromo *b* (Fe^{3+}) + $e^- \rightleftharpoons$ citocromo *b* (Fe^{2+})	+0,12
Citocromo *c* (Fe^{3+}) + $e^- \rightleftharpoons$ citocromo *c* (Fe^{2+})	+0,22
Citocromo *a* (Fe^{3+}) + $e^- \rightleftharpoons$ citocromo *a* (Fe^{2+})	+0,29
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O$	+0,82

sus electrones más fácilmente que los pares con potenciales redox negativos más pequeños o positivos. Los compuestos con potenciales negativos grandes se consideran como agentes reductores fuertes. Por otro lado, un oxidante fuerte (caracterizado por un potencial muy positivo) tiene una elevada afinidad por los electrones, por lo que actúa oxidando compuestos con potenciales estándar más negativos.

La **ecuación de Nernst** caracteriza la relación entre el potencial estándar de oxidación–reducción de un determinado par redox (E_0'), el potencial observado (E) y la proporción de las concentraciones de oxidante y reductor en el sistema:

$$E = E_0' + 2{,}3\ RTn\mathcal{F}\ \log\left(\frac{[\text{oxidante}]}{[\text{reductor}]}\right)$$

donde E es el potencial observado cuando todos los reactivos están presentes a concentración 1 M; E_0' es el potencial estándar a pH 7,0; R es la constante de los gases que vale 8,3 J grado^{-1} mol^{-1}; T es la temperatura absoluta en unidades kelvin (K); n es el número de electrones transferidos; y $\mathcal{F}$ es la constante de Faraday, cuyo valor es 96 500 J V^{-1} mol^{-1}.

Cuando el potencial observado es igual al potencial estándar, se define un potencial conocido como del punto medio. En este potencial del punto medio la concentración de oxidante es igual a la concentración de reductor. El conocimiento de los potenciales de oxidación–reducción estándar de una serie de reacciones bioquímicas permite predecir la dirección del flujo o la transferencia de electrones cuando más de un par redox están unidos mediante el enzima adecuado que permite la reacción. Por ejemplo, tal como se muestra en la Tabla 13.6, el par NAD^+–NADH tiene un potencial estándar de −0,32 V y el par piruvato–lactato posee un potencial de −0,19 V. Esto significa que los electrones fluirán desde el sistema del NAD^+–NADH al sistema del piruvato–lactato mientras el componente enzimático (lactato deshidrogenasa) esté presente, por ejemplo,

$$\text{piruvato} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{lactato} + NAD^+$$

En el sistema de transferencia electrónica se producen electrones o equivalentes de reducción en las reacciones de deshidrogenasas ligadas al NAD^+ o al FAD que tienen potenciales estándar iguales o parecidos al del par de oxidación–reducción NAD^+–NADH. Los electrones se transfieren a continuación a través de la cadena de transporte electrónico que tiene como aceptor final el par de oxidación–reducción oxígeno–agua con un potencial estándar redox de +0,82 V.

Variaciones de energía libre en las reacciones redox

Las diferencias en los potenciales de oxidación–reducción de dos pares redox son similares a los cambios de energía libre en una reacción química, en tanto que am-

bas cantidades dependen de la concentración de los reactivos y productos de la reacción. Entre ellos existe la siguiente relación:

$$\Delta G^{o\prime} = -n\mathcal{F}\,\Delta E'_0$$

Utilizando esta fórmula se puede obtener la variación de energía libre de las reacciones de oxidación–reducción si se conoce la diferencia de potencial entre los dos pares de oxidación–reducción. De ahí que en el proceso de la transferencia electrónica mitocondrial en la que se transfieren los electrones entre el par NAD^+–NADH ($E'_0 = -0{,}32$ V) y el par $\frac{1}{2}O_2$–H_2O ($E'_0 = +0{,}82$ V) se puede calcular la variación de energía libre de este proceso:

$$\Delta G^{o\prime} = -n\mathcal{F}\,\Delta E'_0 = -2 \times 96{,}5 \text{ kJ V}^{-1} \times 1{,}14 \text{ V}$$
$$\Delta G^{o\prime} = -219 \text{ kJ mol}^{-1}$$

en donde 96,5 es la constante de Faraday en kJ V^{-1} y n el número de electrones que se transfieren; por ejemplo, en el caso del NADH $\rightarrow O_2$, $n = 2$. Así, la energía libre disponible a partir de la distancia entre el potencial del NADH y el del oxígeno en la cadena de transporte electrónico es capaz de generar más energía de la necesaria para sintetizar tres ATP por cada dos equivalentes de reducción o dos electrones transportados hasta el oxígeno. Además de ello, debido al signo negativo de la energía libre disponible en el proceso de la transferencia electrónica, éste es exergónico y tiene lugar siempre que estén presentes los componentes enzimáticos necesarios.

El transporte de electrones mitocondrial es un sistema multicomponente

Los pasos finales de la oxidación global de los alimentos (glúcidos, grasas y aminoácidos) dan lugar a la formación de NADH y $FADH_2$ en la matriz. La cadena de transporte electrónico oxida estos cofactores reducidos mediante la transferencia de electrones en una serie de pasos hasta el oxígeno, que es el aceptor electrónico terminal, al tiempo que captura la energía libre de las reacciones de oxidación-reducción para impulsar la síntesis de ATP. Durante la eliminación de electrones de los coenzimas también se eliminan protones que son bombeados desde la matriz a través de la membrana interna para formar un gradiente electroquímico que proporciona energía para la síntesis de ATP (véase Figura 13.30). Los diversos transportadores electrónicos implicados en la transferencia de electrones desde el NADH hasta el oxígeno tienen potenciales estándar de reducción que abarcan la zona desde el dador electrónico más electronegativo, el NADH, con un potencial de reducción estándar de −0,32 V, hasta el aceptor electrónico más electropositivo, el oxígeno, con un potencial de reducción estándar de +0,82 V (Tabla 13.6). Mientras que los electrones se extraen de los reactivos con potenciales de reducción más negativos y se transfieren a aceptores electrónicos con potenciales de reducción más positivos, los transportadores electrónicos mitocondriales no se encuentran formando un orde-

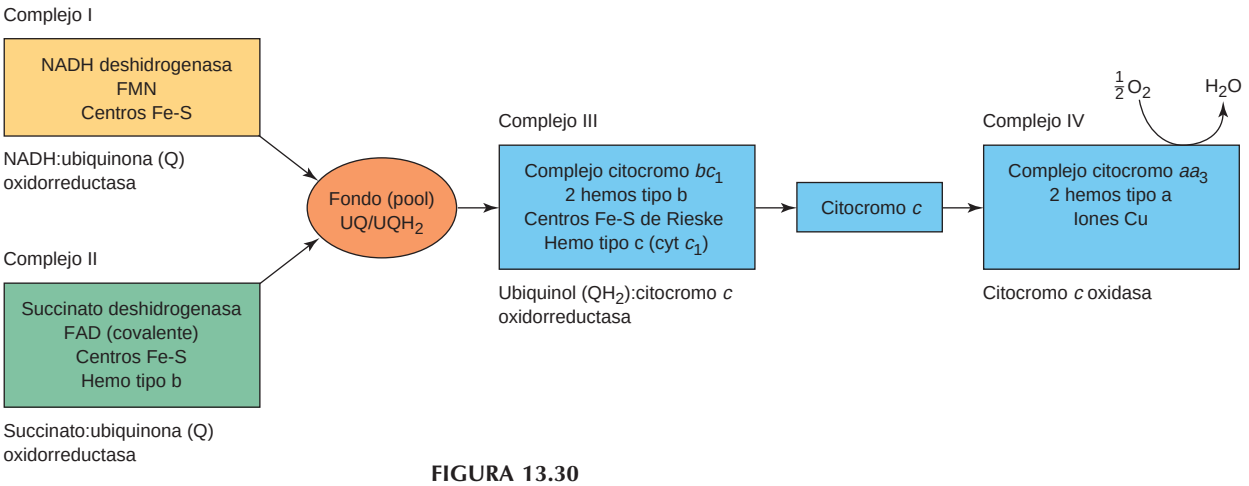


FIGURA 13.30
Visión general de los complejos y rutas de transferencia electrónica de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

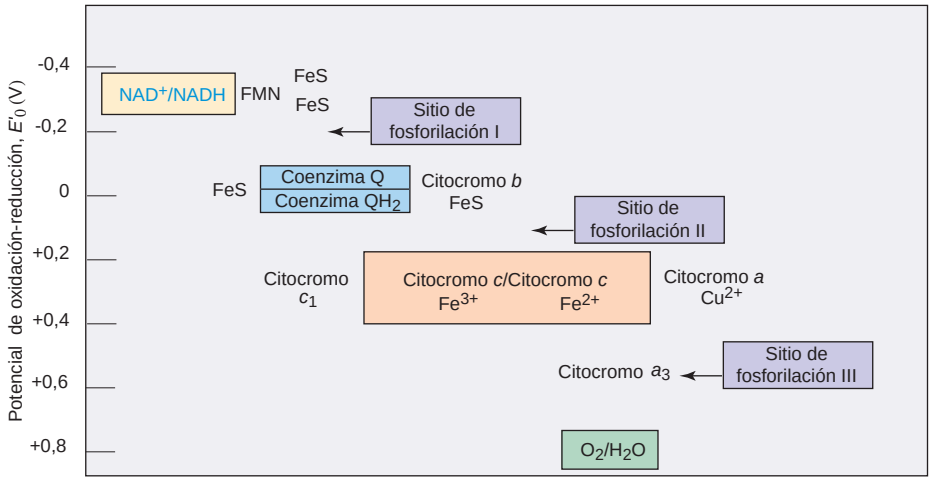


FIGURA 13.31
Potenciales de oxidación–reducción de los transportadores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

namiento lineal. En su lugar, los transportadores electrónicos están agrupados en cuatro grandes complejos enzimáticos con múltiples subunidades (complejos I a IV) que catalizan diferentes reacciones parciales de la cadena de transporte electrónico.

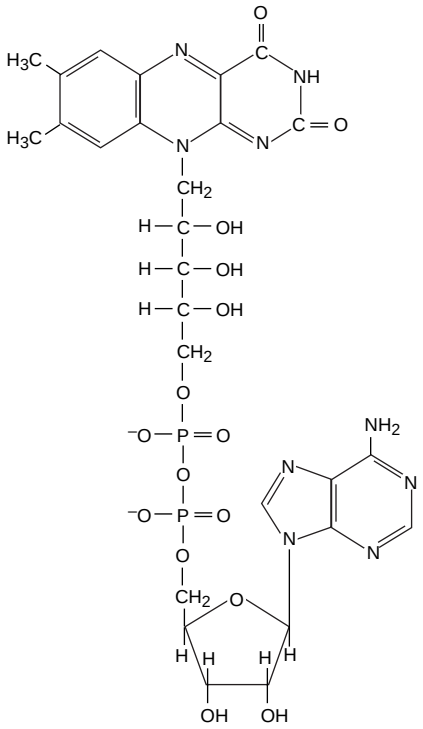
Los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico son los siguientes: **complejo I**, NADH-ubiquinona oxidorreductasa, que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la **ubiquinona (UQ)**, también conocida como **coenzima Q (CoQ)**; **complejo II,** succinato-ubiquinona oxidorreductasa o succinato deshidrogenasa, que transfiere electrones desde el succinato al coenzima Q; **complejo III,** complejo **del citocromo *bc*$_1$,** ubiquinol-citocromo *c* reductasa, que transfiere electrones desde el ubiquinol (forma reducida de la ubiquinona abreviada **$CoQH_2$** o **UQH_2**) al **citocromo *c***; y **complejo IV**, citocromo *c* oxidasa, que transfiere electrones desde el citocromo *c* al oxígeno (véase Figura 13.30). Otro complejo multiproteico, la **ATP sintasa,** también llamada **complejo V,** usa energía del gradiente electroquímico producido durante la transferencia de electrones para la síntesis de ATP (véase Figura 13.30). Tal como se muestra en la Figura 13.31, los potenciales de reducción estándar de los transportadores electrónicos de los cuatro complejos abarcan la zona de potenciales redox desde el NADH hasta el oxígeno. Estos cuatro complejos están formados por diferentes transportadores electrónicos, entre los que se encuentran **flavoproteínas** que contienen FMN o FAD fuertemente unido y que pueden transferir uno o dos electrones, los **citocromos** que son proteínas que contienen hemo (citocromo *b, c*$_1$*, c, a* y *a*$_3$) que transfieren un electrón desde el Fe^{2+} del hemo, las **proteínas ferrosulfuradas** que contienen Fe y S inorgánicos unidos y que transfieren un electrón y **cobre** en el complejo IV (citocromo *c* oxidasa) implicado en la transferencia de un electrón. UQ participa en transferencias de uno o dos electrones. En la sección siguiente se describe detalladamente la estructura y función de los cuatro complejos.

Complejo I: NADH-Ubiquinona oxidorreductasa

El complejo I es el más complicado y, en los mamíferos, está formado por al menos 40 polipéptidos diferentes con una masa molecular de aproximadamente 1 000 000 Da. El complejo I, a menudo llamado NADH deshidrogenasa, oxida NADH y transfiere electrones a la ubiquinona (coenzima Q). El primer paso en la oxidación del NADH implica la transferencia de dos electrones y dos protones desde el NADH al **FMN**, flavina mononucleótido (véase Figura 13.32), cofactor fuertemente unido a una subunidad polipeptídica del complejo I. Se adicionan dos electrones y dos protones al doble enlace de la riboflavina, la parte reactiva del FMN, también conocida como vitamina B_2.

$$NADH + H^+ + FMN \rightleftharpoons NAD^+ + FMNH_2$$

Los electrones se transfieren a continuación desde el FMN a través de una serie de centros FeS, tanto 2Fe2S como 4Fe4S (véase Figura 13.33) a la ubiquinona. Un pa-



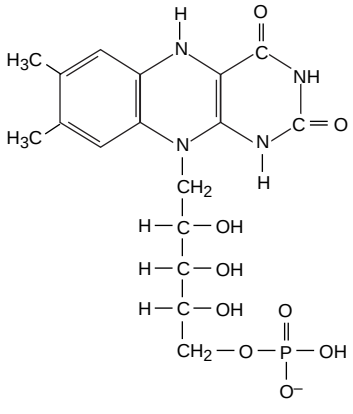


FIGURA 13.32
Estructuras del flavina adenina dinucleótido (FAD) y del flavina mononucleótido ($FMNH_2$).

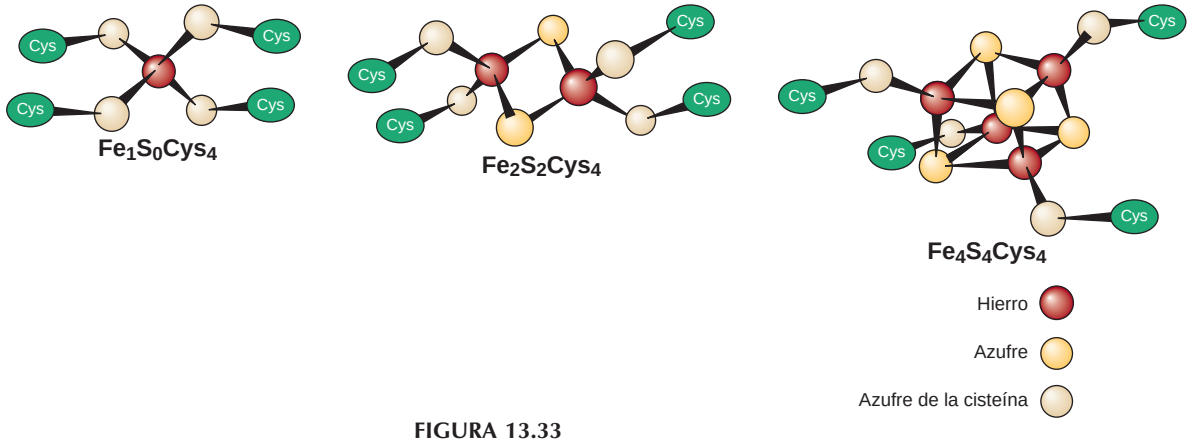


FIGURA 13.33
Estructura de los grupos ferrosulfurados.
Amarillo, azufre inorgánico; gris, azufre de la cisteína; rojo, hierro.

pel importante del FMN en el complejo I es servir tanto de aceptor de dos electrones del NADH como dador de un electrón a los centros FeS. La capacidad del FMN para actuar como transportador tanto de uno como de dos electrones proviene de la existencia de una forma semiquinona estable del FMN. La ubiquinona, aceptor electrónico final del complejo I, también puede actuar como aceptor de uno o dos electrones debido a la presencia de un intermedio semiquinona estable (Figura 13.34). Además de su parte quinona hidrofílica, la ubiquinona también tiene una larga cadena lateral hidrofóbica formada por 10 unidades de isopreno que está enterrada en la bicapa lipídica de la membrana. La ubiquinona y el ubiquinol pueden difundir libremente en la membrana y pueden actuar transfieriendo electrones desde los complejos I y II al complejo III, ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa.

Durante la oxidación de un NADH y transferencia de dos electrones a la ubiquinona por el complejo I, también se bombean cuatro protones a través de la membrana mitocondrial desde el lado de la matriz (**N** de cara negativa) al lado citosólico (**P** de cara positiva). La energía liberada durante las reacciones de oxidación que tienen lugar en el complejo I se conserva mediante el bombeo concomitante de protones a través de la membrana. Poco se sabe acerca del mecanismo por el que se transfieren los protones a través de la membrana durante la transferencia electrónica en el complejo I. La Figura 13.35 proporciona una representación esquemática de los procesos que tienen lugar durante la transferencia de electrones y el bombeo de protones a través del complejo I.

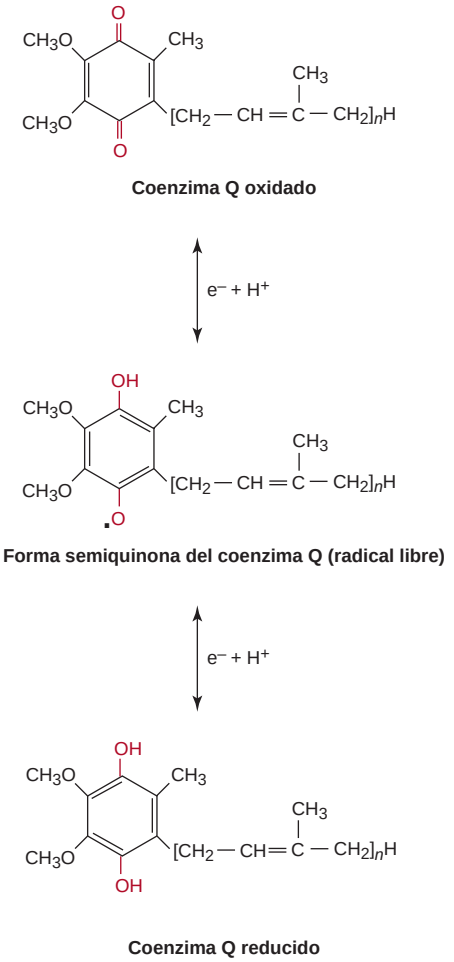


FIGURA 13.34
Oxidación y reducción de la ubiquinona (coenzima Q).
Obsérvese que la ubiquinona puede puede aceptar un solo electrón cada vez, formando un intermedio semiquinona.

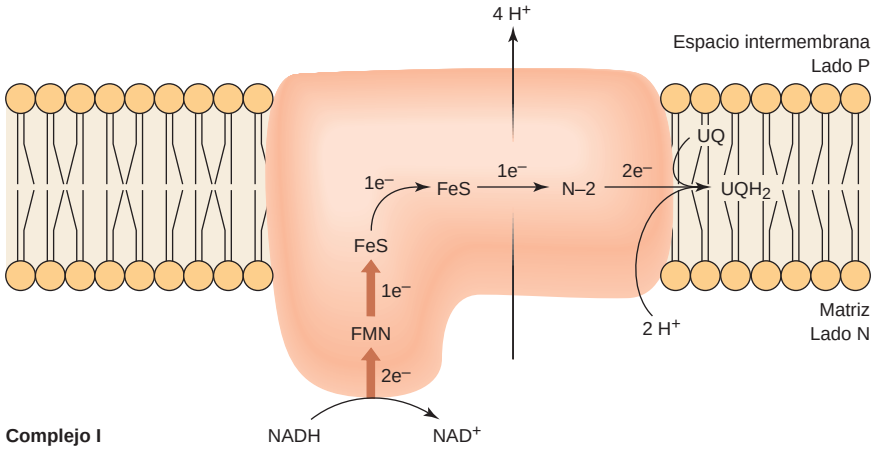


FIGURA 13.35
Modelo del complejo I.
Se indica la presencia tanto de dominios de membrana como periféricos. Los electrones se transfieren desde el NADH a la ubiquinona (UQ) en la membrana vía FMN y varios centros FeS.

Complejo II: Succinato-ubiquinona oxidorreductasa

El complejo II, más conocido como **succinato deshidrogenasa**, cataliza la oxidación del succinato. El complejo está formado por cuatro subunidades: una subunidad de masa molecular 70 000 Da que contiene FAD unido covalentemente a un residuo de histidina, una subunidad de 30 000 Da que contiene tres centros ferrosulfurados y dos proteínas hidrofóbicas pequeñas. Durante la oxidación del succinato a fumarato se transfieren primeramente dos electrones y dos protones al FAD (Figura 13.36). El $FADH_2$ así formado transfiere electrones a la ubiquinona vía los centros FeS del complejo II en las dos reacciones siguientes:

$$\text{succinato} \rightarrow \text{fumarato} + 2\ H^+ + 2\ e^-$$

$$UQ + 2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow UQH_2$$

$$\text{(globlal)} \qquad \text{succinato} + UQ \rightarrow \text{fumarato} + UQH_2$$

$$\Delta E_0' = 0{,}029\ \text{V}; \qquad \Delta G^{o\prime} = -5{,}6\ \text{kJ mol}^{-1}$$

La pequeña cantidad de energía libre formada durante la oxidación del succinato y transferencia de electrones a la ubiquinona es insuficiente para bombear protones a través de la membrana mitocondrial, por lo que en las reacciones del complejo II no hay ganancia de energía libre. La Figura 13.36 proporciona una representación esquemática de los acontecimientos que tienen lugar durante la transferencia de electrones a través del complejo II.

Otras deshidrogenasas flavoproteínas mitocondriales

Otras deshidrogenasas localizadas en la mitocondria alimentan de electrones la cadena de transporte electrónico a nivel de la ubiquinona. El glicerol 3-fosfato liberado en la formación de glicerol a partir de triacilgliceroles o por reducción de la dihidroxiacetona fosfato producida durante la glucólisis, se oxida mediante la **glicerol 3-fosfato deshidrogenasa** (véase Figura 13.36). Esta flavoproteína contiene una cadena polipeptídica sencilla y está localizada en la cara exterior de la membrana interna en donde transfiere electrones directamente a la ubiquinona de la membrana mitocondrial. En la sección 13.8 (p. 583) se discute la importancia de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa en el lanzamiento de equivalentes de reducción desde el NADH del citosol a la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

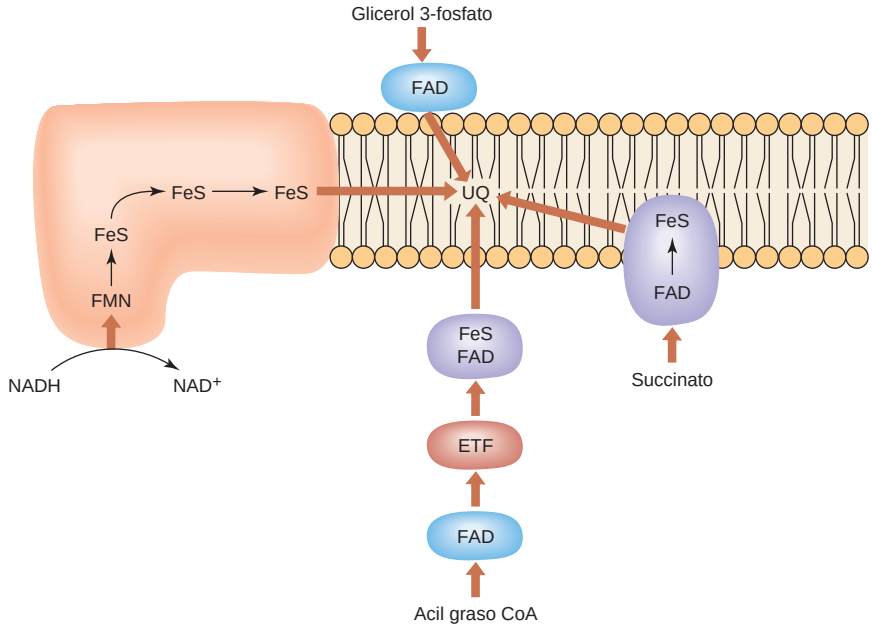


FIGURA 13.36
Reducción de la ubiquinona (UQ) en la membrana mitocondrial interna por las flavoproteínas NADH, succinato, glicerol 3-fosfato y acil graso-CoA deshidrogenasas.

La segunda deshidrogenasa de importancia en el metabolismo intermediario es la **acil-CoA deshidrogenasa**, una flavoproteína que cataliza el primer paso en la β-oxidación de los ácidos grasos. Este enzima transfiere electrones desde acil grasos-CoA al FAD de la deshidrogenasa, que se transfieren seguidamente a la flavoproteína transferidora de electrones (**ETF**, *electron transferring flavoprotein*). Los electrones se transfieren a continuación desde la ETF a la **ETF-ubiquinona oxidorreductasa** que transfiere electrones directamente a la ubiquinona situada en la membrana interna. La Figura 13.36 ilustra la reducción del fondo (pool) de ubiquinona por estas deshidrogenasas con flavoproteína incluidas el complejo I, el complejo II, la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y la ETF-ubiquinona oxidorreductasa. El ubiquinol producido por estas deshidrogenasas es oxidado por el complejo III.

Complejo III: Ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa

El complejo III, también llamado complejo citocromo bc_1, cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo *c* acoplada a la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial interna. En los mamíferos este complejo enzimático consta de 11 subunidades de las que tres tienen grupos prostéticos que actúan como centros redox. Estas son el **citocromo *b*** y el **citocromo c_1,** cada uno de los cuales contiene un grupo hemo y la **proteína ferrosulfurada de Rieske**, que contiene un agrupamiento 2Fe2S. La resolución reciente de la estructura competa del complejo III por cristalografía de rayos X ha proporcionado una valiosa información estructural que ha sido de utilidad en la explicación de observaciones bioquímicas previas y en sugerir nuevos aspectos sobre la función de este complejo (Figura 13.37). En la estructura cristalina, el complejo dimérico con una masa molecular de 250 000 Da para cada monómero, tiene forma de pera con un gran dominio que sobresale 75 Å hacia la matriz mitocondrial y un dominio más pequeño que contiene los dominios de la cabeza de la proteína ferrosulfurada de Rieske y del citocromo c_1 sobresaliendo hacia el espacio intermembrana. El dominio transmembrana del complejo III está formado por ocho hélices α de la proteína hidrofóbica, el citocromo *b* además de hélices de anclaje a la membrana de la proteína ferrosulfurada, el citocromo c_1 y otras subunidades del complejo.

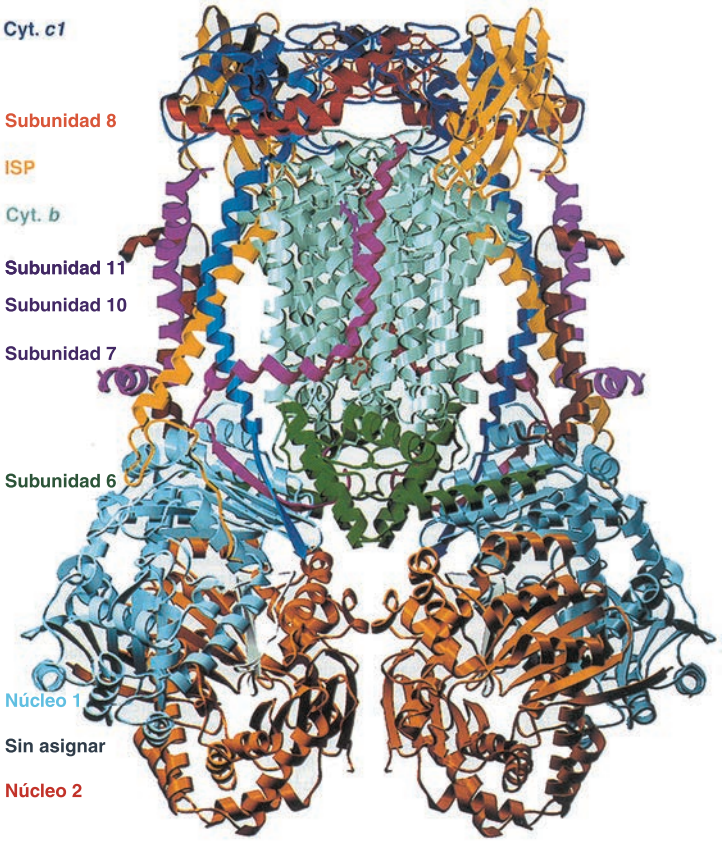


FIGURA 13.37
Modelo de la estructura cristalina del complejo dimérico citocromo bc_1.
Las hélices α del citocromo *b* (verde pálido) forman el dominio transmembrana del complejo. El enzima sobresale 75 Å hacia la matriz y 38 Å hacia el espacio intermembrana. Los colores que identifican las subunidades se muestran a la izquierda.
Reproducido con permiso de Kim, H., Xia, D., Yu, C.-A., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., y Deisenhofer, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95:8026, 1998. Copyright 1998, National Academy of Sciences, U.S.A. Figura cedida generosamente por el Dr. J. Deisenhofer.*

Citocromos

Los citocromos son una clase de proteínas que contienen un grupo hemo que contiene hierro unido fuertemente a la proteína (véase p. 1063). A diferencia del grupo hemo de la hemoglobina o de la mioglobina, en las que el hierro del hemo permanece en el estado Fe^{2+}, el hierro en el hemo de un citocromo está alternadamente oxidado (Fe^{3+}) o reducido (Fe^{2+}) cuando funciona en la cadena de transporte electrónico. Los citocromos de las mitocondrias de mamífero se designan *a*, *b* y *c* en base a la banda ***α*** de su espectro de absorción y al tipo de grupo hemo unido a la proteína (véase Figura 13.38). La banda de absorción de los diferentes citocromos y sus potenciales redox estándar dependen de la estructura del hemo y de su entorno en la proteína. El citocromo *b* y otros **citocromos tipo *b*** contienen hierro-protoporfirina IX (véase Figura 13.38), el mismo hemo que se encuentra en la hemoglobina y en la mioglobina. El hemo del citocromo *b* está, sin embargo, sepultado dentro de la membrana y no puede fijar oxígeno. Los **citocromos tipo *c*** contienen hemo *c* que está unido de forma covalente a residuos de cisteína de la proteína vía enlaces tioéter en los que están implicadas las cadenas laterales vinilo de la estructura de la protoporfirina IX. Los **citocromos tipo *a*** contienen hemo *a* que es una forma modificada de la protoporfirina IX (véase p. 1063) en la que se ha añadido

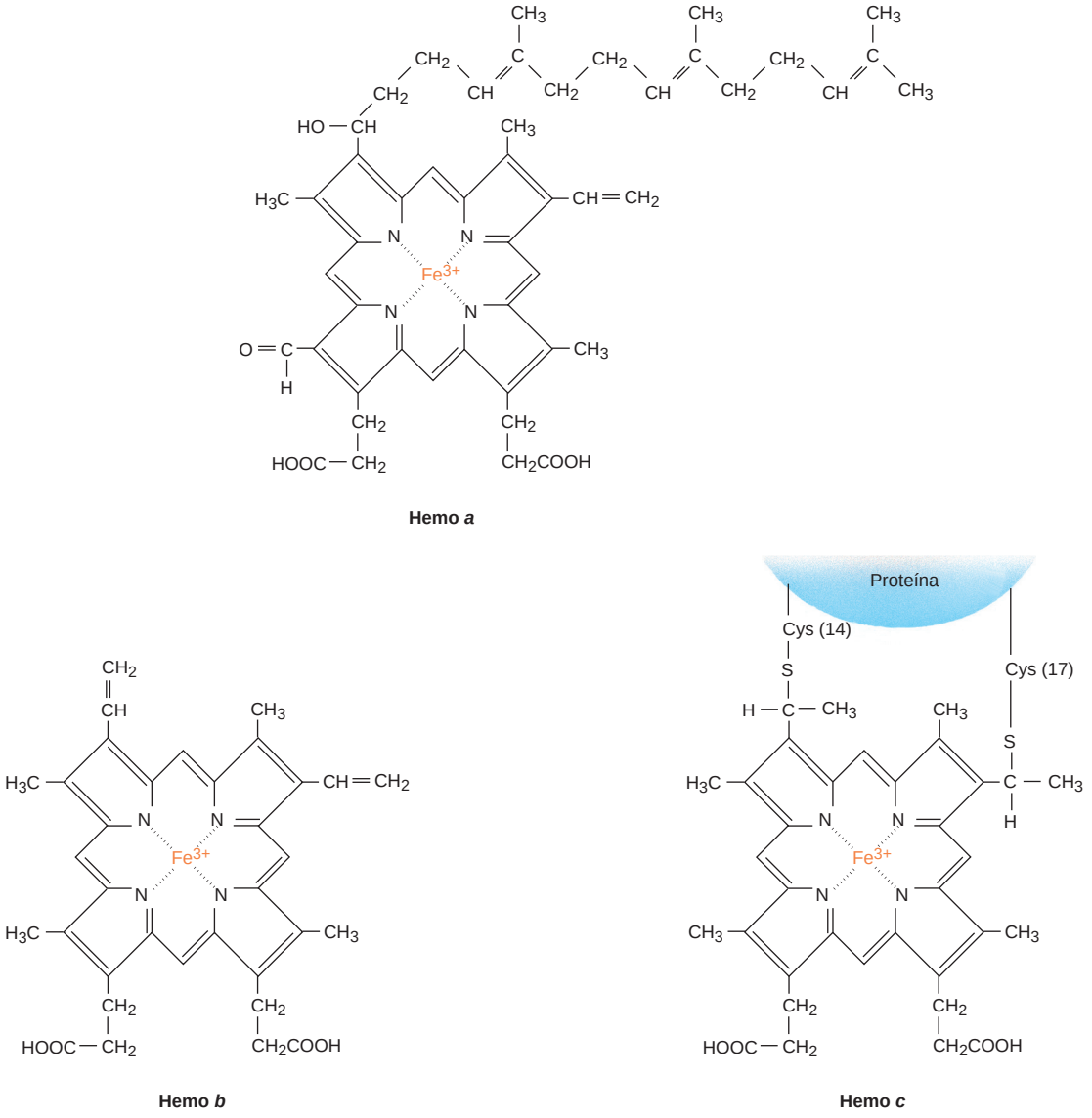


FIGURA 13.38
Estructuras del hemo *a*, hemo *b* y del hemo *c*.

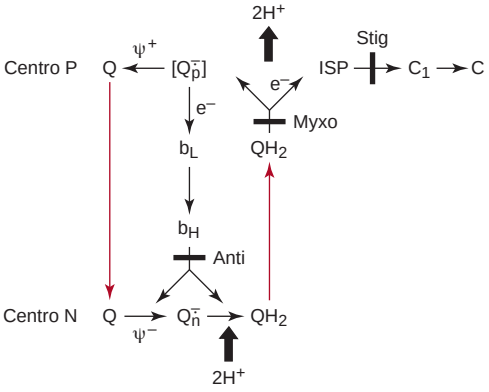


FIGURA 13.39
Ciclo Q.
El ciclo Q explica la transferencia de electrones a través del complejo citocromo bc_1. QH_2 es el ubiquinol reducido, $[Q^-_p]$ es la semiquinona formada en el centro Q_O y Q^-_n es la semiquinona formada en el centro Q_I. ISP es la proteína ferrosulfurada. Se indican los sitios de los inhibidores mixotiazol (Myxo), estigmatelina (Stig) y antimicina (Anti).

a la molécula un grupo formilo y una cadena lateral isoprenoide. En la citocromo *c* oxidasa, complejo IV de la cadena de transporte electrónico, están presentes dos formas de citocromo *a*.

Mecanismo del ciclo Q para la transferencia de electrones y bombeo de protones en el complejo III

Dos grupos hemo *b* con potenciales redox diferentes, un hemo de alto potencial, +0,50 V, y un hemo de bajo potencial, −0,100 V, están unidos al citocromo *b* en el complejo citocromo bc_1, o complejo III. El complejo III también contiene un citocromo tipo *c*, conocido como **citocromo c_1**. La transferencia de electrones a través del complejo III tiene su mejor explicación en el **mecanismo del ciclo Q** en el que se translocan cuatro protones a través de la membrana mitocondrial por cada dos electrones transferidos desde el ubiquinol al citocromo *c* (Figura 13.39). Para que continúe la transferencia de electrones según el ciclo Q, se requieren dos sitios de unión ubiquinol o ubiquinona en el complejo bc_1. Un sitio de oxidación del ubiquinol (Q_O) que implica el hemo *b* de bajo potencial (**hemo b_L**) está localizado en el lado positivo (P) de la membrana, en donde se pueden unir inhibidores tales como el mixotiazol. Un sitio reductor de la ubiquinona (Q_i) que implica el hemo *b* de elevado potencial (hemo b_H) está localizado en el lado negativo (N) de la membrana donde se unen inhibidores tales como la antimicina. La oxidación del ubiquinol en el sitio Q_O da como resultado la transferencia de un electrón al agrupamiento 2Fe2S de la proteína ferrosulfurada, que a su vez es oxidada por transferencia de un electrón al hemo del citocromo c_1. El anión ubisemiquinona, fuertemente reductor, formado durante la oxidación del ubiquinol en el sitio Q_O reduce inmediatamente el hemo de bajo potencial del citocromo b_L que rápidamene transfiere un electrón al hemo de alto potencial del citocromo b_H en el sitio Q_i. El citocromo b_H reducido se oxida a continuación por transferencia de un electrón a la ubiquinona en el sitio Q_i para formar una ubisemiquinona estable. Para completar el ciclo Q se oxida una segunda molécula de ubiquinol en el sitio Q_O que transfiere un electrón a la proteína ferrosulfurada y un segundo electrón al hemo *b* con reducción final de la ubisemiquinona en el sitio Q_i para formar ubiquinol. En conjunto, el ciclo Q proporciona un mecanismo que explica la observación de que se bombean cuatro protones a través de la membrana interna durante la transferencia de dos electrones desde el ubiquinol al citocromo *c*. Se captan dos protones en el lado de la matriz de la membrana interna para reducir la ubiquinona en el sitio Q_i, mientras que se liberan cuatro protones en el lado citosólico de la membrana durante la transferencia de dos electrones a la proteína ferrosulfurada y al citocromo c_1.

Se ha propuesto el movimiento de la proteína ferrosulfurada durante la transferencia electrónica en el complejo III

Estudios cristalográficos recientes indican que la **proteína ferrosulfurada** puede existir en varias conformaciones diferentes en el complejo III dependiendo tanto de la forma cristalina como de la presencia de inhibidores específicos. En una conformación el grupo de la cabeza de la proteína ferrosulfurada que contiene el **agrupamiento 2Fe2S** está localizado al lado de uno de los bucles extramembranosos del citocromo *b* que forma el sitio Q_O. En una segunda conformación, el agrupamiento 2Fe2S del grupo de la cabeza está cerca de su aceptor electrónico, el hemo del citocromo c_1, mientras que en otras conformaciones el agrupamiento 2Fe2S se encuentra entre el citocromo *b* y el citocromo c_1. Así, este grupo de la cabeza de la proteína ferrosulfurada puede moverse durante la transferencia de electrones a través del complejo III. Varias aproximaciones experimentales han proporcionado pruebas bioquímicas para esta sugerencia. Un modelo que explica la transferencia de electrones a través del complejo bc_1 sugiere que cuando el ubiquinol se une al sitio Q_O y es desprotonado, el grupo de la cabeza de la proteína ferrosulfurada se aproxima más al citocromo *b* adoptando el estado "*b*". El ubiquinol desprotonado ligado en el sitio Q_O es oxidado entonces mediante un mecanismo concertado en el que se transfiere un electrón al agrupamiento 2Fe2S de la proteína ferrosulfurada, mientras que el segundo electrón es transferido inmediatamente al hemo de bajo potencial en el sitio Q_O. La ubiquinona se libera de la cavidad fijadora de Q_O seguido por el posterior movimiento de la proteína ferrosulfurada reducida al estado "c_1" próximo al hemo del citocromo c_1 (véase Figura 13.40).

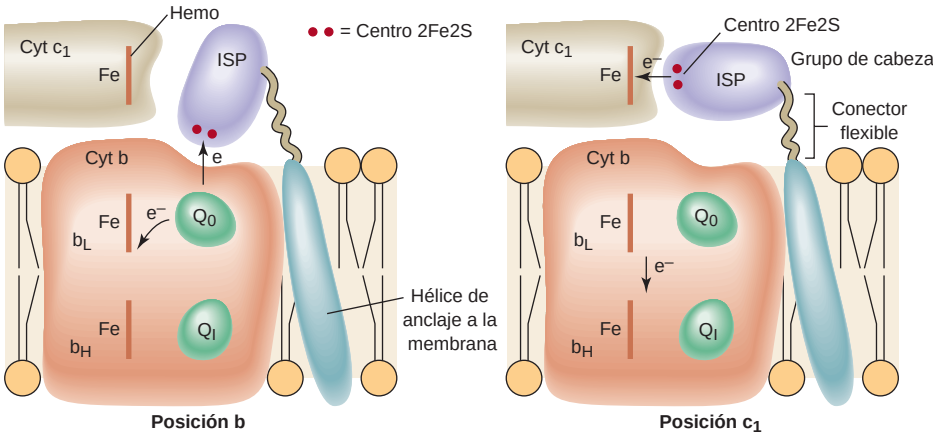


FIGURA 13.40
Movimiento propuesto de la proteína ferrosulfurada durante el transporte electrónico a través del complejo citocromo *bc*$_1$.
En la posición "b" el agrupamiento ferrosulfurado (2Fe2S) está localizado sobre el grupo de cabeza de la proteína ferrosulfurada (ISP) que está unida sobre el citocromo *b* cerca del sitio Q_O. En la posición "c_1", el grupo de cabeza de la ISP está anclado de manera tal que el agrupamiento 2Fe2S está próximo al hemo del citocromo c_1.

El citocromo c es un transportador de electrones móvil

A través del complejo III se transfieren electrones al **citocromo *c***, una pequeña proteína hidrofílica con una masa molecular de 13 000 Da. El citocromo *c* es una proteína globular con el grupo hemo plano situado en el centro de la proteína rodeado por residuos hidrofóbicos y unido de forma covalente a dos restos de cisteína conservados en la proteína a través de enlaces éter vinilo (véase Figura 13.38). El hierro en el anillo de la porfirina está coordinado con el nitrógeno de una histidina y con el átomo de azufre de una metionina, impidiendo así la interacción del hemo con el oxígeno (Figura 13.41).

El citocromo *c*, al igual que la ubiquinona, funciona como un transportador móvil en la cadena de transporte electrónico. La proteína está débilmente unida a la superficie exterior de la membrana interna mediante fuerzas electrostáticas en donde se une al citocromo c_1 del complejo III y acepta electrones. El citocromo *c* reducido aparentemente se desplaza a continuación a lo largo de la superficie de la membrana en donde interacciona con la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa, aquí también mediante uniones electrostáticas, y cede sus electrones al sitio Cu_A.

Complejo IV: Citocromo *c* oxidasa

El complejo IV cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo *c* al oxígeno que es el aceptor electrónico terminal para formar agua en un mecanismo acoplado a la translocación de protones a través de la membrana. Este complejo enzimático con múltiples subunidades de la mitocondria de mamíferos contiene 13 subunidades con una masa molecular de 200 000 Da y contiene como componentes redox dos citocromos, ***a*** y ***a*$_3$**, y dos centros de cobre conocidos como **Cu_A** y **Cu_B**. En las membranas bacterianas se encuentra una citocromo *c* oxidasa más sencilla formada por sólo tres o cuatro subunidades, pero que cataliza unas reacciones de transferencia de electrones y bombeo de protones similares a las del enzima más complejo de mamífero. De este modo parece que sólo tres subunidades del complejo IV son esenciales para que el enzima sea funcional. Las tres subunidades presentes en las citocromo *c* oxidasas bacterianas son homólogas a las tres subunidades mayores de la citocromo *c* oxidasas y que están codificadas en el DNA mitocondrial (mtDNA). Las restantes subunidades del complejo IV de mamíferos están codificadas en el DNA nuclear y podrían funcionar ya sea como subunidades reguladoras o en el ensamblaje del enzima. Además, la identificación de isozimas específicos de tejido de ciertas subunidades del complejo IV codificadas en el núcleo constituye una indicación del papel regulador de estas subunidades.

Se han resuelto las estructuras cristalinas tanto de la citocromo *c* oxidasa bacteriana como del complejo IV aislado de mitocondrias de corazón de buey (Fi-

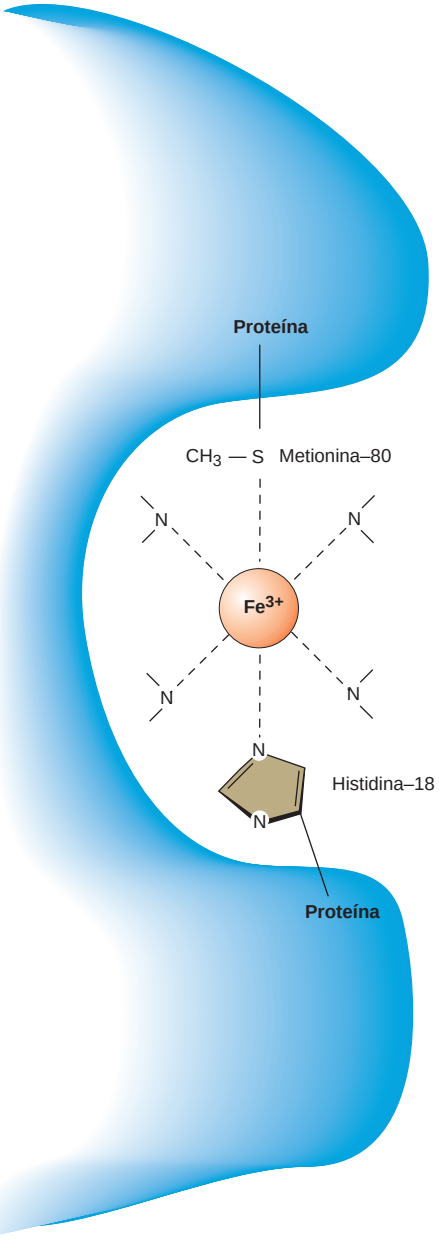


FIGURA 13.41
Las seis posiciones de coordinación del citocromo *c*.

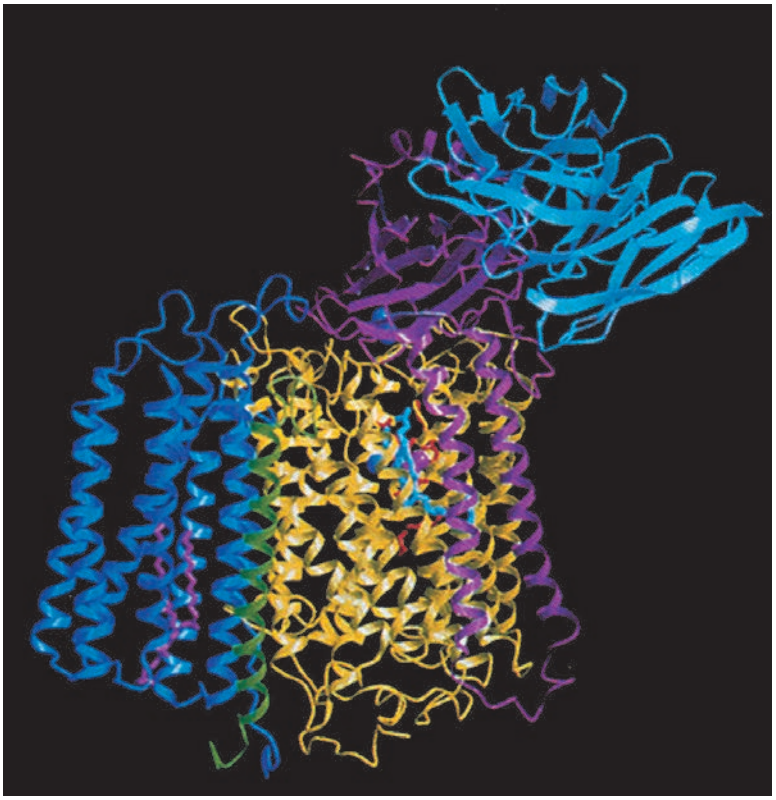


FIGURA 13.42
Modelo de la estructura cristalina de la citocromo *c* oxidasa de la bacteria *Paracoccus denitrificans*.
La subunidad I está en amarillo, la subunidad II en púrpura y la subunidad III en azul con un fosfolípido incrustado en rosa. El fragmento de anticuerpo utilizado para promover la cristalización es de color lila.
Reproducido con permiso de Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H., et al. Nature 376::660, 1995. *Copyright 1995, McMillan Magazines Limited. Figura cedida generosamente por el Profesor S. Iwata.*

gura 13.42). La subunidad I, el polipéptido mayor del complejo, contiene 12 hélices transmembrana pero carece de dominios extramembranosos significativos. Dos grupos hemo, *a* y a_3, están unidos a la subunidad I de tal manera que el hierro del anillo de la protoporfirina está coordinado con átomos de nitrógeno de residuos de histidina conservados. Los planos tanto del hemo *a* como del a_3 son perpendiculares a la membrana. Además, la subunidad I contiene un átomo de cobre **(Cu_B)** que con el hemo a_3 forma un centro binuclear implicado en la transferencia de electrones desde el hemo *a* al oxígeno (Figura 13.43). La subunidad II de la citocromo *c* oxidasa tiene un dominio grande que sobresale del lado citosólico de la membrana interna, en donde se une el citocromo *c* reducido, y que contiene dos átomos de cobre (llamados **Cu_A**) unidos a través de grupos sulfhidrilo a dos cisteínas. La subunidad III contiene siete hélices transmembrana sin prácticamente dominios extramembranosos negligibles pero no contiene ningún transportador redox. Las subunidades II y III están localizadas en lados opuestos de la subunidad I; no está claro cuál es el papel de la subunidad III.

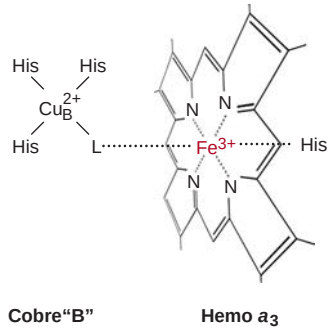


FIGURA 13.43
Centro binuclear de la citocromo *c* oxidasa en el que se indica el hemo a_3 y Cu_B.

Rutas de transferencia electrónica a través del complejo IV

Los electrones se transfieren desde el citocromo *c* reducido al sitio Cu_A de la subunidad II y, a continuación, al hemo *a* de la subunidad I del complejo IV (Figura 13.44). El Cu_A y el hemo *a* están localizados a una distancia de 1,5 Å el uno del otro, lo que permite la transferencia rápida de electrones. Los electrones se transfieren a continuación al centro binuclear que está formado por Cu_B y hemo a_3 en donde se produce la transferencia final de electrones al oxígeno. Inicialmente se transfieren dos electrones a un O_2 firmemente unido al centro binuclear para formar un derivado peroxi del oxígeno (O_2^{2-}). Dos electrones más se transfieren al centro binuclear con la captación concomitante de cuatro protones de la matriz para formar agua. Dado que cada uno de los transportadores redox presentes en el complejo IV son transportadores de un electrón y la reducción del O_2 a agua requiere cuatro electrones, las reacciones catalizadas por este enzima han evolucionado de tal manera que se impide la liberación de los intermedios tóxicos del oxígeno parcialmente reducido, tales como los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno o

hidroxilo (véase sección 13.10, p. 590). Cada uno de los intermedios formados en la reducción del O_2 permanece unido firmemente al centro binuclear con lo que se impide su disociación del enzima hasta que se forma agua.

El complejo IV también bombea protones

Tal como se ha discutido anteriormente, la reducción del O_2 por cuatro electrones para formar agua catalizada por el complejo IV también implica la captación de cuatro protones desde la matriz mitocondrial. No está clara la ruta de captación de protones, pero resultados experimentales sugieren que aminoácidos cargados localizados en la subunidad I están implicados en la formación de un canal para el movimiento de protones. Además de los protones requeridos para la formación de agua, la citocromo *c* oxidasa también bombea protones adicionales a través de la membrana, lo que contribuye al gradiente electroquímico. En la estequiometría global de bombeo de protones por la citocromo *c* oxidasa durante la transferencia de dos electrones al O_2, se liberan dos protones al citosol por cada cuatro protones captados por la matriz (Figura 13.44).

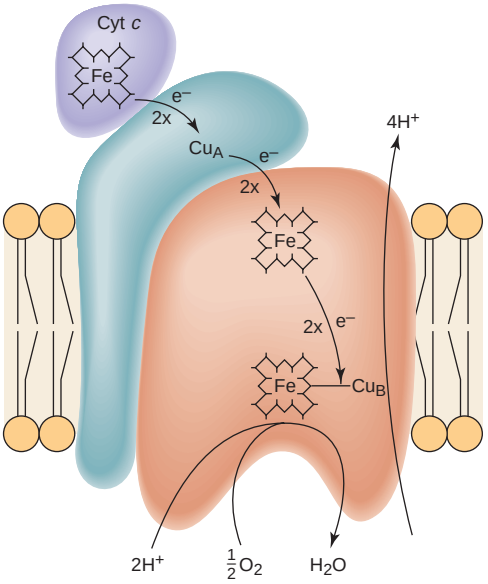


FIGURA 13.44
Rutas de la transferencia de electrones a través de la citocromo *c* oxidasa. El citocromo *c* se une a la superficie de la subunidad II y transfiere electrones a Cu_A. Los electrones se transfieren desde Cu_A al hemo *a* y seguidamente al centro binuclear (hemo a_3 y Cu_B) en donde el oxígeno es reducido a agua.

Visión global de la cadena de transporte electrónico incluidos los inhibidores

Nuestro conocimiento cada vez más profundo de la química detallada de los diferentes complejos de la cadena respiratoria ha desarrollado una imagen dinámica de la cadena de transporte electrónico (Figura 13.45). Cada uno de los cuatro complejos es independiente dentro de la membrana interna y se puede mover libremente. Los complejos I y II, además de otras deshidrogenasas flavoproteínas, difunden en la membrana y transfieren electrones al fondo (pool) de ubiquinona de la membrana. El ubiquinol reducido también difunde libremente en la membrana, donde interacciona con el complejo III y es oxidado por él. Los electrones se transfieren desde el complejo III al citocromo *c*, el cual se desplaza a lo largo de la membrana hacia el complejo IV en donde es oxidado y los electrones se transfieren en último término al O_2. Durante el transporte de electrones desde el NADH o flavoproteínas reducidas a lo largo de la cadena de transporte electrónico hasta el O_2, se bombea un total de diez protones a través de la membrana mitocondrial interna desde la matriz al espacio intermembrana. Se bombean cuatro protones durante la transferencia de dos electrones a través de los complejos I y III y dos protones durante la transferencia de dos electrones a través del complejo IV. El gradiente electroquímico así formado proporciona una fuente de energía potencial que se utiliza para impulsar la síntesis de ATP por la ATP sintasa, tal como se discute en la Sección 13.7 (p. 577).

La cadena de transporte electrónico ilustrada en la Figura 13.45 también indica que existen una serie de sitios a los que se unen inhibidores específicos que bloquean el flujo electrónico. Por ejemplo, la **rotenona,** un insecticida utilizado frecuentemente, se fija de manera estequiométrica al complejo I impidiendo la reducción de la ubiquinona. Otros agentes tales como la **piericidina,** el **amital** y otros barbituratos también inhiben el complejo I al impedir la transferencia de electrones desde los centros ferrosulfurados a la ubiquinona. El complejo II es inhibido por la **carboxina** y la **teniltrifluoroacetona**, así como por el **malonato**, que actúa como inhibidor competitivo del sustrato succinato. La **antimicina** inhibe la transferencia electrónica a través del complejo III, complejo citocromo bc_1, al unirse al sitio Q_i y bloquear la transferencia de electrones desde el hemo de alto potencial b_H a la ubiquinona. Otros antibióticos tales como el **mixotiazol** y la **estigmatelina**, inhiben la transferencia de electrones a través del complejo III al unirse al sitio Q_O y bloquear la transferencia de electrones desde el ubiquinol al centro 2Fe2S de la proteína ferrosulfurada. El complejo IV es inhibido por **cianuro** (CN^-), **azida** (N_3^-) y **monóxido de carbono** (CO). El cianuro y la azida se unen fuertemente a la forma oxidada del hemo a_3 (Fe^{3+}) e impiden la transferencia de electrones desde el hemo *a* al centro binuclear. Por el contrario, el monóxido de carbono se une a la forma reducida del hemo a_3 (Fe^{2+}) competitivamente con el O_2, con lo que impide la transferencia de electrones al O_2. De ahí que la inhibición del transporte electrónico mitocondrial perjudique la función de generación de energía de la fosforilación oxidativa, lo que conduce a la muerte del organismo (véase Apli. Clín. 13.3 para una discusión de la toxicidad del cianuro).

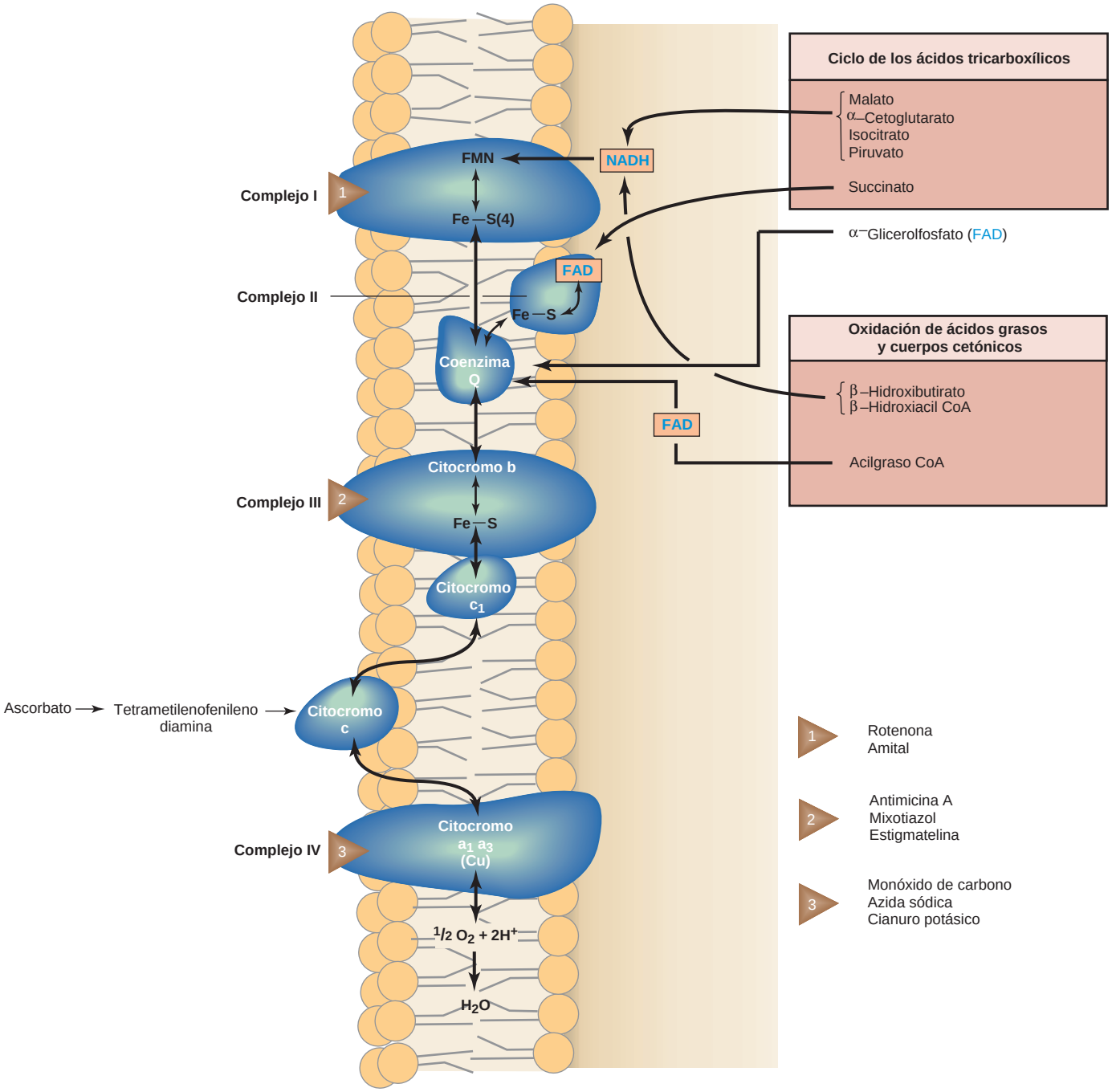
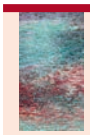


FIGURA 13.45
Visión general de la cadena de transporte electrónico en la que se indican las rutas de transferencia de electrones y los sitios de unión de inhibidores específicos, rotenona, amital, antimicina A, mixotiazol, estigmatelina, monóxido de carbono, azida sódica y cianuro potásico.

Cada uno de los cuatro complejos se puede aislar y estudiar de forma independiente de los otros complejos. Las reacciones de transferencia electrónica y bombeo de protones de cada complejo individual tienen lugar en los complejos aislados en los que se pueden investigar más fácilmente los mecanismos implicados. Los polipéptidos presentes en cada uno de los complejos están fuertemente asociados en las relaciones estequiométricas adecuadas para formar estos complejos enzimáticos multiproteína que catalizan reacciones parciales de la cadena de transporte electrónico. Los éxitos recientes en la determinación de las estructuras cristalinas de los complejos III y IV y de la ATP sintasa han proporcionado un mayor conocimiento de sus estructuras y funciones.



APLICACIÓN CLÍNICA 13.3

Envenenamiento por cianuro

La inhalación de cianuro de hidrógeno (ácido cianhídrico) gaseoso o la ingestión de cianuro potásico produce una rápida y extensa inhibición de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en la etapa de la citocromo oxidasa. El cianuro es uno de los venenos de actuación más rápida y potente que se conocen. Se fija al Fe^{3+} del hemo a_3, de la citocromo *c* oxidasa que cataliza el paso final en la cadena de transporte electrónico, e impide que el oxígeno se fije al centro binuclear y sirva como aceptor último de electrones. Cesan la respiración mitocondrial y la generación de energía, y se produce la muerte rápida de la célula. La muerte debida al envenenamiento por cianuro tiene lugar por asfixia tisular, muy especialmente del sistema nervioso central. Si el envenenamiento se diagnostica rápidamente, se administran al individuo, como antídoto, diversos nitritos que transforman la oxihemoglobina en methemoglobina, lo cual supone solamente convertir el Fe^{2+} de la hemoglobina en Fe^{3+} de la methemoglobina. La methemoglobina (Fe^{3+}) compite con el citocromo a_3 (Fe^{3+}) por el cianuro, formando así un complejo methemoglobina–cianuro. La administración de tiosulfato hace que el cianuro reaccione con el enzima rodanasa y forma tiocianato, un compuesto no tóxico.

Holland, M. A. y Kozlowski, L. M. Clinical features and management of cyanide poisoning. *Clin. Pharmacol.* 5:737, 1986.

13.7 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Durante la transferencia de electrones desde el NADH y otros sustratos respiratorios al O_2 vía cadena de transporte electrónico mitocondrial, se translocan protones a través de la membrana interna y se establece un **gradiente de protones y carga** (Figura 13.46). La energía liberada durante las reacciones de transferencia de electrones, que son exergónicas, se utiliza para bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna. Este bombeo de protones a través de la membrana da lugar a una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana, de tal manera que el espacio intermembrana se vuelve más ácido mientras que el espacio de la matriz se vuelve más alcalino. Simultáneamente la cara externa de la membrana interna adquiere una carga más positiva, mientras que la cara de la matriz está cargada más negativamente debido a la energía eléctrica potencial resultante de la transferencia de un ion cargado positivamente (H^+) a través de la membrana sin la compensación de un ion cargado negativamente.

Durante la transferencia de dos electrones desde el NADH al O_2 se bombean aproximadamente diez protones a través de la membrana para establecer el **gradiente electroquímico.** La energía libre total obtenida por la translocación de protones y la distribución de carga a través de la membrana puede calcularse mediante la siguiente ecuación, en la que Z es el valor absoluto de la carga, $\mathcal{F}$ es la constante de Faraday y $\Delta\psi$ es el potencial de membrana:

$$\Delta G = 2{,}3RT\,\Delta\text{pH} + Z\mathcal{F}\,\Delta\psi$$

En mitocondrias que respiran activamente el cambio de pH observado a través de la membrana es de 0,75-1,0 unidades de pH y el cambio observado en el potencial de membrana es 0,15-2,0 V. De ahí que el valor de ΔG calculado para mitocondrias en respiración es de aproximadamente 200 kJ para la transferencia de 10 H^+ a través de la membrana durante la transferencia de electrones desde el NADH al O_2. La ΔG para esta reacción también se puede calcular a partir de la diferencia en potenciales redox estándar del dador y del aceptor electrónicos. La ΔG calculada para los pares electrónicos del NADH y el O_2 es 219 kJ mol^{-1} (Sección 13.6, véase p. 566), lo que sugiere que la energía de las reacciones de transferencia electrónica se captura de forma eficiente en el potencial electroquímico. La energía almacenada en el gradiente electroquímico, a menudo denominada **fuerza protón motriz,** se utiliza para impulsar la síntesis de ATP mediante el movimiento de protones a favor del gradiente electroquímico a través de la ATP sintasa. Este proceso, denominado **quimiosmosis,** fue propuesto originariamente por el profesor Peter Mitchell que obtuvo el Premio Nobel en 1978. Más adelante, en esta misma sección, se discute el mecanismo detallado por el que el movimiento de protones a través de la ATP sintasa está acoplado con la síntesis química de ATP.

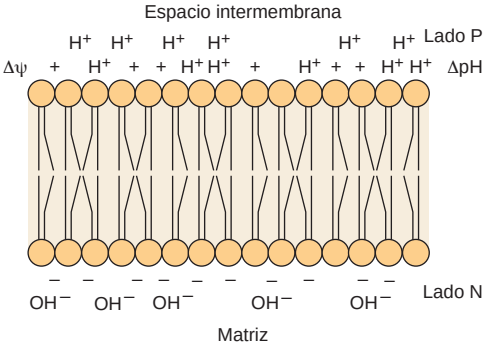


FIGURA 13.46
El gradiente electroquímico está formado por un gradiente de cargas ($\Delta\Psi$) y de concentración de protones (ΔpH) a través de la membrana mitocondrial interna.

Acoplamiento de la síntesis de ATP con el transporte electrónico

La velocidad de utilización del ATP, reflejo de la necesidad de ATP por parte de la célula, regula la velocidad de síntesis de ATP en la mitocondria, la cual, a su vez, re-

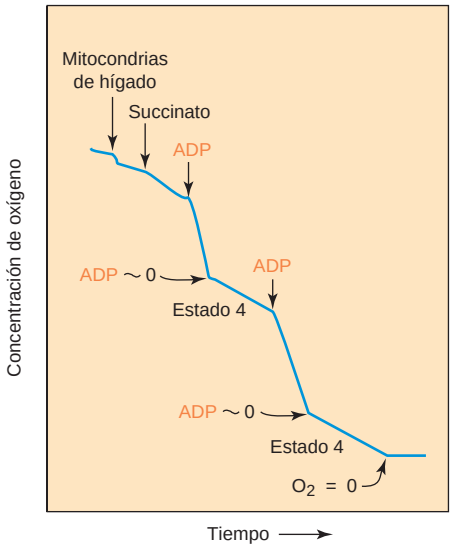


FIGURA 13.47
Demostración del acoplamiento entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa en una suspensión de mitocondrias de hígado.
La adición de ADP estimula la velocidad de transferencia electrónica medida como captación de oxígeno definida como control respiratorio.

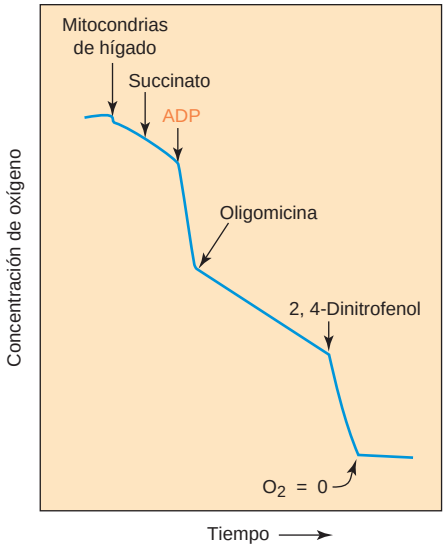


FIGURA 13.48
Inhibición y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hígado.
La estimulación de la captación de oxígeno por el ADP es inhibida por la oligomicina, que bloquea el movimiento de protones a través de F_0 de la ATP sintasa. La adición del desacoplador dinitrofenol libera la inhibición por oligomicina y estimula la velocidad de captación de oxígeno.

gula la velocidad de transferencia de electrones. El acoplamiento de la síntesis de ATP al transporte electrónico se consigue gracias al gradiente electroquímico, tal como se ilustra en el experimento de la Figura 13.47. La velocidad de transporte electrónico mitocondrial monitorizada por la medida de la velocidad de consumo del O_2 por una suspensión de mitocondrias hepáticas sólo puede darse rápidamente después de la adición de un dador electrónico (succinato en este experimento) y ADP (aceptor de fosfato) más fosfato (P_i). Después de la conversión a ATP de todo el ADP añadido externamente, la velocidad de transporte electrónico vuelve a la velocidad observada antes de la adición de ADP. De ahí que la velocidad de transporte electrónico, o respiración, esté estrechamente acoplada a la síntesis de ATP. El modelo quimiosmótico puede explicar fácilmente esta relación, denominada control respiratorio. Cuando las necesidades energéticas de la célula son bajas, se acumula ATP y no se utiliza el gradiente de protones para la síntesis de ATP. La magnitud del gradiente de protones aumenta hasta que la energía requerida para bombear protones a través de la membrana desde la matriz contra el gradiente eléctrico existente iguala la energía liberada durante la transferencia de electrones desde el NADH al O_2. En este punto, cesa el transporte electrónico ya que se ha alcanzado el equilibrio. En las células que utilizan ATP, se acumula ADP, y esto estimula la ATP sintasa. A medida que se sintetiza ATP, la magnitud del gradiente de protones disminuirá a medida que los protones pasan a través de la ATP sintasa proporcionando la energía para la síntesis de ATP. Como resultado de ello disminuye la contrapresión protónica sobre la cadena de transporte electrónico. El aumento en la velocidad de transporte electrónico a través de la cadena estimula la oxidación del NADH, lo que tiene como consecuencia la formación de NAD^+. Las mayores concentraciones de NAD^+ junto con las mayores concentraciones de ADP en las células con utilización activa de ATP actúan estimulando las reacciones del ciclo TCA y de la oxidación de los ácidos grasos. De esta forma, la necesidad de ATP por parte de una célula actúa regulando de forma coordinada la velocidad del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, así como las reacciones del ciclo TCA y de la oxidación de los ácidos grasos.

Razones P/O para el transporte electrónico mitocondrial y fosforilación oxidativa

La **razón P/O** (fosfato incorporado en ATP a átomos de O_2 utilizados) es una medida del número de moléculas de ATP formadas durante la transferencia de dos electrones a través de un segmento de la cadena de transporte electrónico. Durante mucho tiempo se creyó que la razón P/O era un número entero: 3 en la transferencia de dos electrones desde los sustratos ligados a NADH hasta el O_2, 2 desde el succinato hasta el O_2 y 1 desde el citocromo *c* reducido hasta el O_2. Estas razones sugerían que se podía producir un ATP durante la transferencia electrónica a través de cada uno de los complejos bombeadores de protones I, III y IV. Sin embargo, con la determinación de que durante la transferencia de dos electrones desde el NAD al O_2 se bombean diez protones a través de la membrana mitocondrial y que se requieren cuatro protones para la síntesis (y translocación) de una molécula de ATP; surgieron dudas sobre las razones P/O reales. Estas estequiometrías protónicas dieron como resultado una razón P/O calculada de 2,5. Determinaciones experimentales recientes proporcionan, desde luego, valores de la razón P/O de aproximadamente 2,5 con sustratos ligados al NADH y de 1,5 con el succinato.

Efecto de desacopladores e inhibidores del sistema de transporte electrónico-fosforilación oxidativa

Tal como se ilustra en la Figura 13.48, la adición del inhibidor de la ATP sintasa, la **oligomicina**, a mitocondrias hepáticas que están respirando activamente en presencia de ADP tiene como consecuencia una inhibición de la velocidad de captación de O_2. La oligomicina bloquea la síntesis de ATP al impedir el movimiento de protones a través de la ATP sintasa. Dado que la síntesis de ATP y el flujo de electrones están íntimamente acoplados, la respiración o transporte electrónico disminuyen a la velocidad observada en ausencia de ADP.

El acoplamiento obligatorio entre transporte electrónico y síntesis de ATP puede "desacoplarse" debido a ciertas condiciones y reactivos químicos tales como el **2,4-dinitrofenol** o la **carbonilcianuro-p-trifluorometoxi fenilhidrazona**. Después de la adición del **desacoplante** a un sistema en el que tanto el consumo de O_2 como de ATP han sido inhibidos por la oligomicina, como el que aparece en la Figura 13.48, se observa un rápido aumento en la velocidad de consumo de O_2.

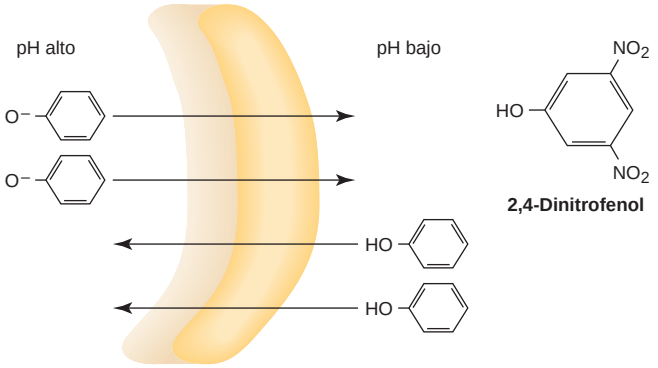


FIGURA 13.49
Acción del desacoplador dinitrofenol, un ionóforo de protón que equilibra el pH a través de la membrana mitocondrial interna.
El dinitrofenol es un ácido débil que capta un protón del espacio intermembrana (lado P de la membrana) que tiene una alta concentración de protones y lo transporta a través de la membrana hacia la matriz (lado N de la membrana) en donde el protón se disocia debido a la baja concentración de protones allí existente.

Dado que ahora la respiración o transporte electrónico está desacoplado de la síntesis de ATP, el transporte electrónico puede continuar aún sin síntesis de ATP. Los agentes desacoplantes son ácidos débiles hidrofóbicos que están protonados en el espacio intermembrana, en donde existe una mayor concentración de protones como resultado de la transferencia electrónica activa. Estos agentes desacoplantes protonados difunden rápidamente a través de la membrana debido a su naturaleza lipofílica y entran en la matriz mitocondrial, en donde se desprotonan porque la matriz tiene una menor concentración de protones. De este modo se disipa totalmente el gradiente de protones, tal como se muestra en la Figura 13.49.

ATP sintasa

La **ATP sintasa**, o complejo V, es un enzima multiproteico que se encuentra en la membrana mitocondrial interna de mamíferos, levaduras y hongos y en la membrana citoplasmática de las bacterias y que cataliza la síntesis de ATP aprovechando la energía del gradiente de protones. El flujo de protones a través de la ATP sintasa a favor del gradiente electroquímico desde el espacio intermembrana positivo a la matriz negativa proporciona la energía para la síntesis de ATP en todos estos organismos. La ATP sintasa está formada por dos dominios: $\mathbf{F_1}$, un complejo enzimático periférico que se observó originalmente en las micrografías electrónicas en forma de pequeñas partículas unidas a la membrana mitocondrial interna (Figura 13.50), y $\mathbf{F_0}$, que es un complejo proteico integral de membrana. El dominio F_1 de la ATP sintasa contiene los sitios de fijación de ATP y ADP e interviene en las reacciones catalíticas de síntesis del ATP. El dominio F_0 está incrustado en la membrana y proporciona un canal para la translocación de protones a través de la membrana. La eliminación de F_1 de la membrana mitocondrial interna, mediante agitación suave, deja una cadena de transporte electrónico intacta capaz de transferencia electrónica pero sin formación de un gradiente protónico. Los protones bombeados a través de la membrana durante la transferencia electrónica fluyen de nuevo a la matriz a través del dominio F_0 en ausencia de F_1. La adición del dominio F_1 a las membranas previamente desprovistas del mismo permite de nuevo la formación de un gradiente protónico a medida que F_1 reconstituye el complejo con F_0 y actúa como tapón que bloquea el flujo de protones a través de F_0. Además, se recupera la capacidad de síntesis de ATP en las membranas a las que se les ha restituido F_1. El F_1 aislado es una ATPasa que cataliza la hidrólisis de ATP, reacción inversa de la síntesis de ATP. Debido a ello, la ATP sintasa se denominó originalmente **$\mathbf{F_1/F_0}$ ATPasa**. La ATP sintasa completa, que contiene tanto F_1 como F_0, puede aislarse y, cuando se incorporan en vesículas membranosas artificiales, es capaz de sintetizar ATP al establecer un gradiente electroquímico a través de la membrana. La incorporación de F_0 purificado a membranas artificiales hace que la membrana sea permeable a los protones.

FIGURA 13.50
Micrografía electrónica del dominio F_1 mitocondrial.
Cortesía del Dr. Parsons. Reproducida con permiso de Parsons, D.F., Science 140:985, 1963. Copyright 1963, American Association for the Advancement of Science.

TABLA 13.7 Subunidades de la F_1F_0-ATP sintasa de *Escherichia coli*

Complejo	*Subunidad proteica*	*Masa (kDa)*	*Estequiometría*
F_1	α	55	3
	β	52	3
	γ	30	1
	δ	15	1
	ε	5,6	1
F_0	a	30	1
	b	17	2
	c	8	9–12

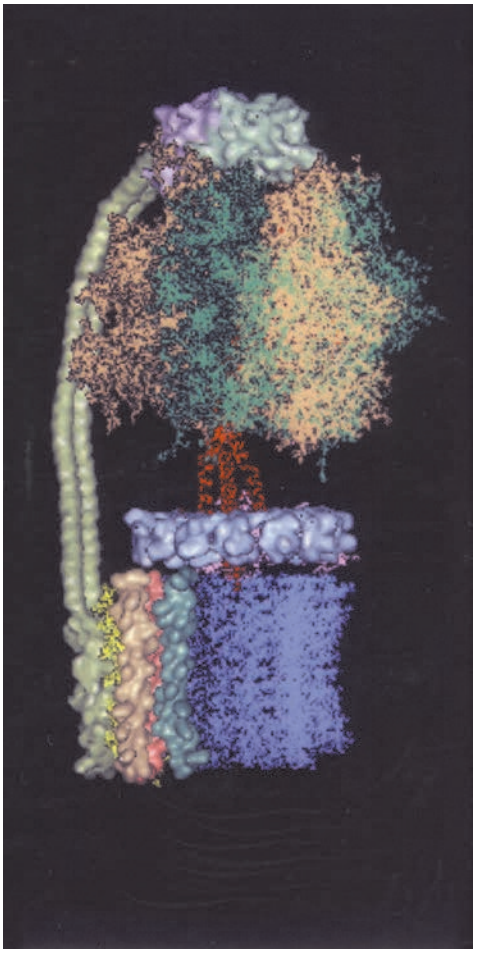


FIGURA 13.51
Modelo de la F_1F_0-ATP sintasa mitocondrial, motor molecular rotatorio.
La síntesis de ATP tiene lugar en el dominio F_1 mientras que el dominio F_0 contiene un canal protónico. Las subunidades a, b, α, β y δ constituyen el estátor, mientras que las subunidades c, γ y ε son el rotor. Los protones fluyen a través de la estructura haciendo que gire el rotor dando lugar a cambios conformacionales en las subunidades β donde se sintetiza ATP.
Figura cedida generosamente por los Dres. Peter L. Pedersen, Young Hee Ko y Sangjin Hong. The Johns Hopkins University School of Medicine. Reproducido con permiso de Pedersen, P. L., Ko, Y. H. y Hong, S. J. Bioenerg. Biomembr. 32:325, 2000.

La ATP sintasa es un complejo formado por múltiples componentes que tiene una masa molecular relativa de 480 000-500 000 (véase Tabla 13.7 y Figura 13.51). El dominio F_1 está compuesto por cinco subunidades no idénticas (α, β, γ, δ y ε) con una estequiometría de subunidades de α_3, β_3, γ, δ, ε y una masa molecular relativa de 350 000-380 000. Se han identificado sitios de unión para el ATP y ADP tanto en las subunidades α como β. Los sitios catalíticos se encuentran en las subunidades β, mientras que se desconoce la función de los nucleótidos unidos a las subunidades α. La subunidad γ forma el núcleo central de F_1, mientras que la subunidad δ puede estar implicada en la unión del dominio F_1 a la membrana. El dominio F_0 del enzima de *E. coli* consta de tres subunidades hidrofóbicas no idénticas denominadas a, b y c que están presentes con una estequiometría aparente a_1, b_2, $c_{9\text{-}12}$. Cada subunidad c contiene un aminoácido esencial cargado (aspartato 61 en *E. coli*) implicado en el bombeo de protones. Cada una de las subunidades c está formada por dos hélices α curvadas que forman una horquilla con el residuo aspartato 61 localizado en medio de la membrana. La mutación de este aspartato a asparagina elimina el bombeo de protones. Mutaciones similares de aminoácidos cargados también indican que la subunidad a de F_0 está implicada en el movimiento de protones mientras que las subunidades b parecen actuar en la unión del dominio F_1 al F_0. El dominio F_0 de la ATP sintasa que se encuentra en las mitocondrias contiene subunidades homólogas de las subunidades a, b y c del enzima de *E. coli*; no obstante, también están presentes otras subunidades que aparecen como partes integrales de F_0.

Síntesis de ATP sobre la superficie de F_1

A partir de experimentos de intercambio de isótopos se dedujeron conocimientos sobre el mecanismo de síntesis de ATP en la superficie catalítica de F_1 que revelaron el hecho de que cuando estaban presentes cantidades estequiométricas de ADP, ATP y fosfato inorgánico junto con F_1 aislado la reacción se encontraba básicamente en el equilibrio con una $\Delta G^{\circ\prime}$ próxima a cero. Esta reacción de intercambio

$$\text{enz:ADP} + P_i \rightleftharpoons \text{enz:ATP}$$

tiene lugar fácilmente en la superficie del enzima, incluso en ausencia de un gradiente de protones. Se concluyó que la síntesis de ATP firmemente unido a F_1 no requiere energía gracias a la naturaleza de la unión de los sustratos a residuos conservados de la subunidad β de F_1. El movimiento de protones a través de la ATP sintasa era necesario para la liberación del ATP de F_1. Por tanto, el movimiento de protones a través del canal de F_0 debe afectar al sitio de unión del ATP en la subunidad β, lo que da como resultado la liberación del ATP. Se propuso que la energía liberada durante el movimiento de protones a través de la membrana producía un cambio conformacional en la ATP sintasa, lo que daba lugar a la liberación del ATP unido fuertemente. El **mecanismo de cambio de unión** sugiere que las tres subunidades β de la ATP sintasa adoptan conformaciones diferentes que cambian durante la catálisis con sólo una subunidad β que actúa como sitio catalítico. Tal como se muestra en la Figura 13.52, una subunidad tiene una conformación abierta (O) con una baja afinidad hacia los ligandos y está vacía. Una segunda subunidad tiene una conformación suelta (L) con baja afinidad hacia los ligandos y es inactiva mien-

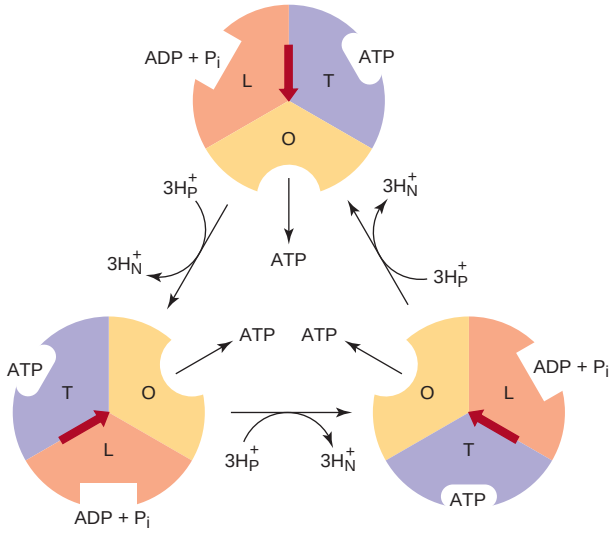


FIGURA 13.52
Modelo de cambio por fijación de síntesis de ATP por la ATP sintasa.

tras que la tercera subunidad tiene una conformación tensa (T) con una elevada afinidad hacia los ligandos y es activa en la catálisis. Según este modelo, la síntesis de ATP tiene lugar sobre la superficie de la subunidad β en la conformación T. Durante la catálisis, los sustratos del enzima, ADP y P_i, se unen a la subunidad β en la conformación L. La energía proporcionada por el paso de protones a través de F_0 a F_1 da lugar a los siguientes cambios conformacionales en las diferentes subunidades β: el sitio L cambia a la conformación T con la consiguiente síntesis de ATP; el sitio O cambia a la conformación L y fija ADP y P_i; y el sitio T cambia a la conformación O con liberación del ATP. Según este modelo, la energía liberada por la transferencia electrónica se conserva en forma de gradiente de protones que fuerza cambios conformacionales en la ATP sintasa, lo que da como resultado la unión de sustratos, la síntesis de ATP sobre el enzima y la liberación del producto ATP.

Estudios estructurales sobre la ATP sintasa

La resolución de la estructura cristalina de F_1 proporcionó una visualización espectacular de las conformaciones de las diferentes subunidades β que aporta pruebas para el modelo de cambio de unión antes descrito. En esta estructura cristalina, subunidades α y β alternantes forman el pomo de F_1 con la única subunidad γ formando un eje central a través del centro de F_1 (fig, 13.53*a, b*). Cada subunidad β tiene una conformación diferente según la presencia o ausencia de sustrato. Así, F_1 cristalizado en presencia de ADP y de un análogo no hidrolizable del ATP mostró la unión del análogo del ATP a una subunidad β, la unión del ADP a una segunda subunidad β y una tercera subunidad β vacía (Figura 13.53*c*).

El modelo desarrollado para la síntesis de ATP es que los protones fluyen a través de la membrana fijándose en primer lugar a aminoácidos acídicos conservados presentes en la subunidad c de F_0, haciendo que gire el anillo de subunidades c unidas a las subunidades γ y ε (Figura 13.51). El movimiento de la subunidad γ produce cambios conformacionales en las subunidades β a medida que las subunidades γ se asocian de manera secuencial con cada subunidad β. Las subunidades a y b de F_0 más la subunidad δ de F_1 forman el "estátor" para mantener en posición las subunidades α y β al tiempo que las subunidades γ y c forman el rotor móvil. El modelo de cambio de unión predice que la subunidad γ debería moverse en una dirección durante la síntesis de ATP y en dirección opuesta durante la hidrólisis de ATP, cuando la energía liberada durante la degradación del ATP se convierte en un gradiente de protones. La rotación de la subunidad γ en una subunidad aislada de F_1 se demostró al unir un polímero de actina fluorescente a la subunidad γ de un F_1 en la que subunidades $\alpha_3\beta_3$ estaban fijadas a un porta de microscopio. Se observó la rotación de la subunidad γ fluorescente al añadir ATP. Se realizaron experimentos similares utilizando el complejo F_1/F_0 completo en el que el complejo de subunidades c junto con la subunidad γ rotaron, tal como indicó la actina fluorescente

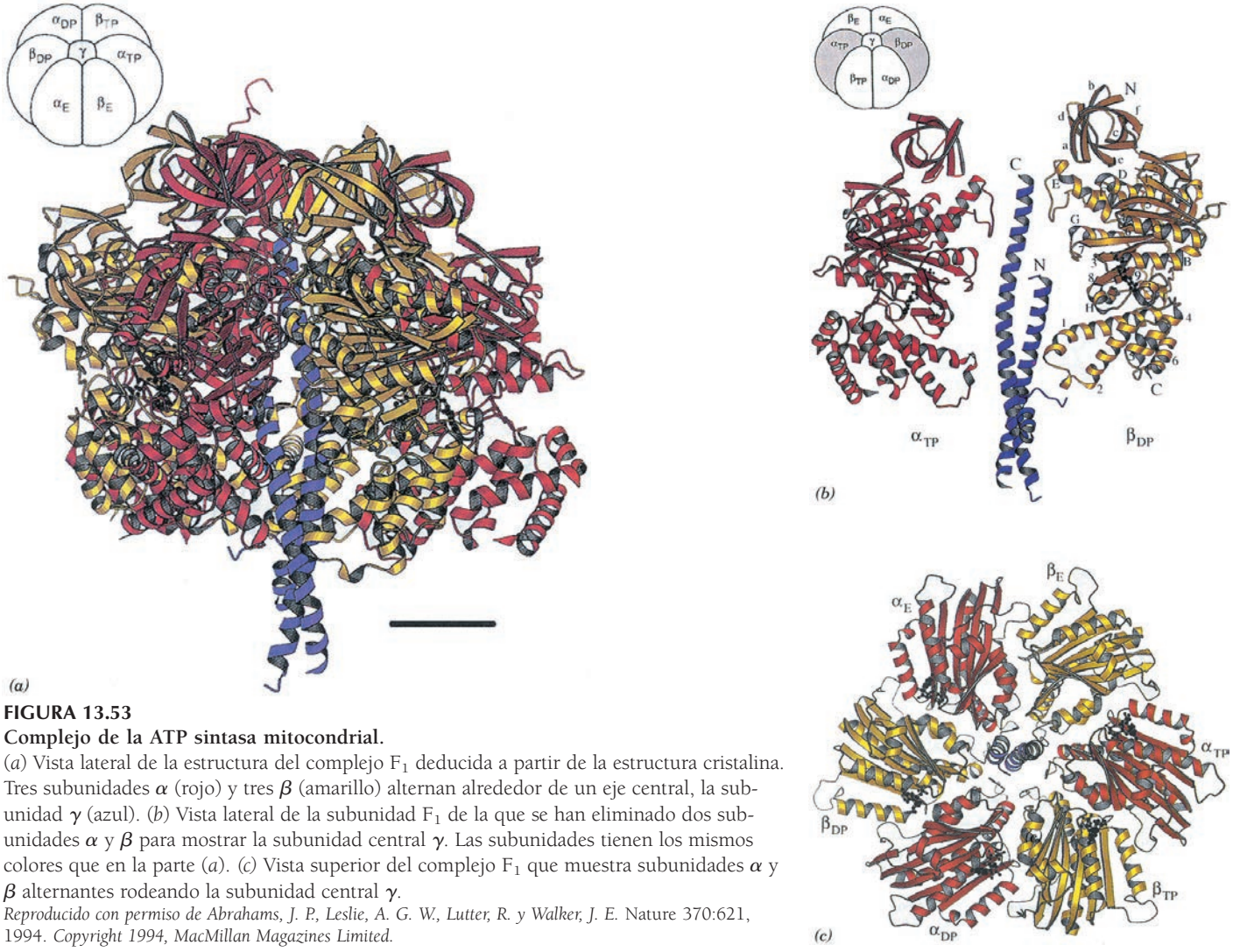


FIGURA 13.53
Complejo de la ATP sintasa mitocondrial.
(*a*) Vista lateral de la estructura del complejo F_1 deducida a partir de la estructura cristalina. Tres subunidades α (rojo) y tres β (amarillo) alternan alrededor de un eje central, la subunidad γ (azul). (*b*) Vista lateral de la subunidad F_1 de la que se han eliminado dos subunidades α y β para mostrar la subunidad central γ. Las subunidades tienen los mismos colores que en la parte (*a*). (*c*) Vista superior del complejo F_1 que muestra subunidades α y β alternantes rodeando la subunidad central γ.
Reproducido con permiso de Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. y Walker, J. E. Nature 370:621, 1994. *Copyright 1994, MacMillan Magazines Limited.*

unida a una subunidad c (Figura 13.54). En ambas condiciones experimentales, el movimiento del rotor no fue continuo, sino que se producía en etapas discretas de aproximadamente 120°, lo que estaba de acuerdo con el movimiento a pasos de la subunidad γ desde una subunidad β a otra. La ATP sintasa es el **motor molecular** más pequeño que se conoce.

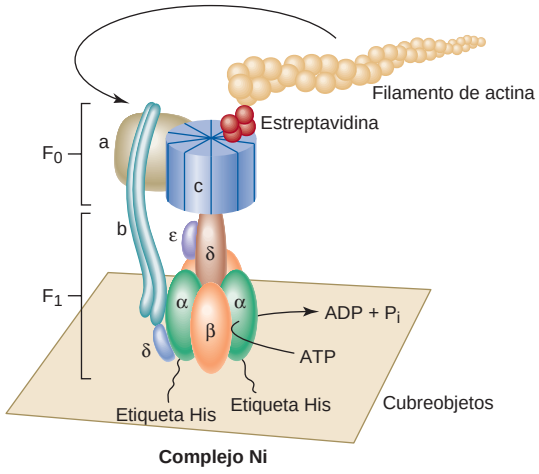


FIGURA 13.54
Prueba experimental de la rotación de las subunidades γ y c.
El dominio F_1 está unido a un cubreobjeto recubierto de níquel por medio de residuos de histidina colocados mediante ingeniería genética en el extremo N terminal de las subunidades α. La biotina, unida covalentemente a las subunidades c, se une muy fuertemente a la proteína estreptavidina, que está unida covalentemente a un filamento de actina que contiene una sonda fluorescente. La adición de ATP, que es hidrolizado por la ATPasa de F_1, hace que el filamento de actina gire en una dirección, lo que demuestra la rotación de la subunidad c de la subunidad F_0. Experimentos anteriores, en los que el filamento de actina estaba unido a la subunidad γ, demostraron que la subunidad γ también puede girar. Probablemente las subunidades γ y c giran de manera solidaria.
Adaptado de Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H. et al. Science 286:1722, 1999.

13.8 LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES INTERNAS POSEEN SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SUSTRATOS

Mientras que la membrana externa no actúa como barrera de permeabilidad, o lo hace en grado mínimo, para los sustratos o moléculas nucleotídicas de interés en el metabolismo energético, la membrana interna limita los tipos de sustratos, intermediarios y nucleótidos que pueden ser transportados a través de ella hacia el compartimiento matricial. La Figura 13.55 ilustra varios sistemas de transporte que se han descrito en las mitocondrias, algunos de los cuales se han caracterizado minuciosamente. Estos sistemas de transporte facilitan el movimiento selectivo de varios sustratos e intermedios a un lado y otro de la membrana mitocondrial interna. Debido a que los transportadores pueden facilitar el movimiento del sustrato contra un gradiente de concentración, en la matriz mitocondrial se pueden acumular diversos sustratos.

Transporte de nucleótidos de adenina y de fosfato

La síntesis continuada de ATP en la matriz mitocondrial requiere que el ADP citosólico formado durante las reacciones que consumen energía sea transportado de nuevo a través de la membrana interna a la matriz, en donde se convierte en ATP. De modo parecido, el ATP recién sintetizado se ha de transportar hacia el citosol a través de la membrana interna para responder a las necesidades energéticas de la célula. Este intercambio de nucleótidos de adenina, que son moléculas hidrofílicas muy cargadas, está catalizado por una **nucleótido de adenina translocasa** muy específica, localizada en la membrana interna (Figura 13.56). La nucleótido de adenina translocasa es un homodímero con dos subunidades de masa molecular relativa de 30 000 que cataliza un intercambio 1:1 de ATP por ADP. La presencia de un sitio de unión de nucleótido en el transportador sugiere que el enzima está alternativamente de cara a la matriz o de cara al espacio intermembrana durante el proceso de transporte. En la matriz el ATP recién sintetizado se une a la translocasa que, a continuación, cambia

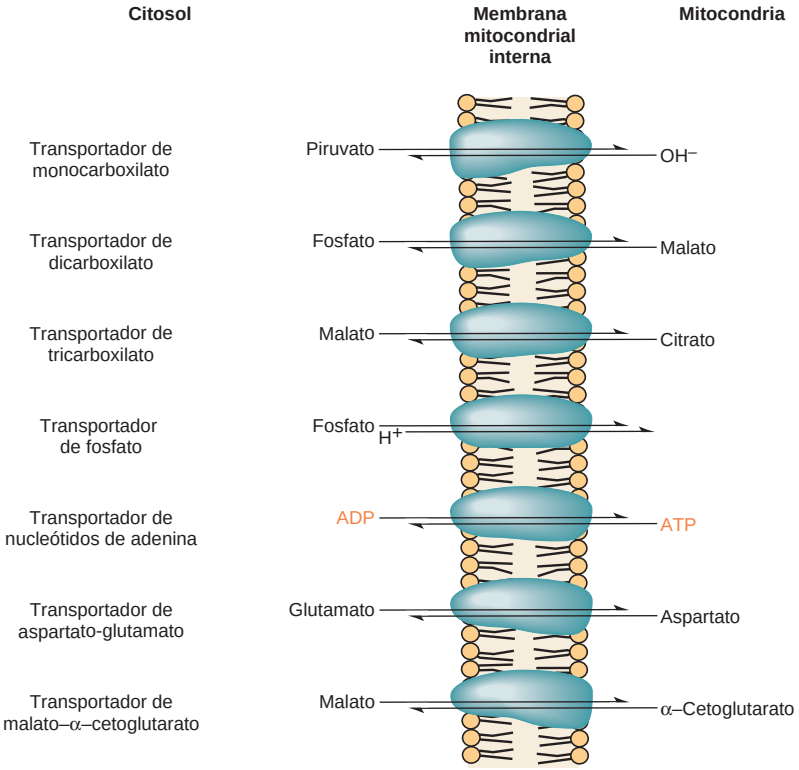


FIGURA 13.55
Transportadores mitocondriales de metabolitos.

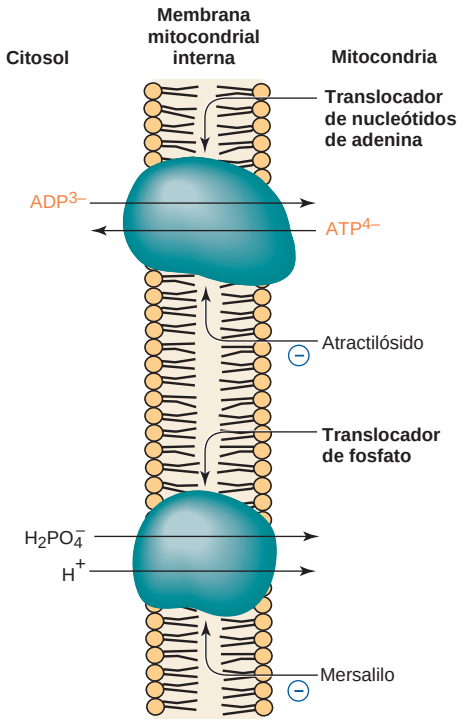


FIGURA 13.56
Translocadores de nucleótidos de adenina y de fosfato.

su conformación para situarlo de cara al citosol, en donde se libera e intercambia con ADP. A continuación la translocasa cambia de nuevo su conformación para enfrentar de nuevo el sitio de unión de nucleótido, que ahora contiene ADP hacia la cara de la matriz. La translocasa favorece el movimiento hacia fuera del ATP y hacia dentro del ADP, a pesar de las observaciones según las cuales ambos nucleótidos se unen con la misma facilidad al sitio de unión. La explicación de esta observación sugiere que, a pH 7, el ADP tiene tres cargas negativas y el ATP cuatro. De ahí que el intercambio igualado de un ATP por un ADP da como resultado un movimiento neto hacia afuera de una carga negativa, lo que equivale a la importación de un protón. El potencial de membrana establecido durante el transporte electrónico es positivo en el exterior, lo que favorecería el transporte hacia afuera del ATP, que tiene mayor carga negativa que el ADP. La nucleótido de adenina translocasa está presente a concentraciones elevadas, hasta un 14% de la proteína total de la membrana interna. De ahí que sea improbable que el transporte de nucleótidos de adenina a través de la membrana mitocondrial interna sea en ningún momento limitante de velocidad.

Un segundo transportador esencial para la fosforilación oxidativa es la **fosfato translocasa**, que transporta fosfato citosólico al interior de la matriz junto con un protón (Figura 13.56). Este cotransporte paralelo también necesita el gradiente de protones ya que se transportan fosfato y protones a la matriz en una proporción 1:1. Este transporte de ADP y fosfato requiere una fracción significativa de la energía presente en el gradiente electroquímico producido durante la transferencia electrónica. Así, la fuerza protón motriz proporciona energía para la síntesis de ATP por la ATP sintasa así como para la captación de los sustratos necesarios.

Las lanzaderas de sustrato transportan equivalentes de reducción a través de la membrana mitocondrial interna

Los nucleótidos implicados en las reacciones de oxidación–reducción celulares (por ejemplo, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH, FAD y $FADH_2$) y el coenzima A y sus derivados no son permeables a la membrana mitocondrial interna. Por ejemplo, para transportar equivalentes de reducción (es decir, protones y electrones) desde el citosol a la matriz mitocondrial y viceversa, se utilizan "mecanismos de lanzadera del sustrato", que suponen la transferencia recíproca de miembros oxidados y reducidos de los diferentes pares de oxidación–reducción con el fin de conseguir la transferencia neta de equivalentes de reducción a través de la membrana.

En la Figura 13.57 se muestran dos ejemplos de cómo tiene lugar esta transferencia de equivalentes de reducción desde el citosol a la matriz. La lanzadera del malato–aspartato y la del α-glicerol fosfato se emplean en varios tejidos para translocar equivalentes de reducción desde el citosol a la matriz, en donde se oxidan para generar energía. La operación de estas lanzaderas de sustrato requiere que los enzimas adecuados estén localizados en el lado correcto de la membrana y que estén presentes los transportadores o translocasas apropiados dentro de la membrana mitocondrial interna o sobre ella. En la **lanzadera del glicerol fosfato**, intervienen dos glicerol fosfato deshidrogenasas diferentes, una localizada en el citosol y la otra en la cara exterior de la membrana mitocondrial interna. El NADH producido en el citosol se utiliza para reducir la dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato catalizada por la glicerol fosfato deshidrogenasa citosólica. El glicerol 3-fosfato es, a su vez, oxidado en las mitocondrias por la glicerol fosfato deshidrogenasa, enzima que contiene FAD, para producir dihidroxiacetona fosfato y $FADH_2$, el cual es oxidado por la cadena de transporte electrónico.

La segunda lanzadera, la **lanzadera del malato-aspartato**, opera según el mismo principio. El NADH del citosol reduce el oxalacetato a malato que entra en las mitocondrias mediante el transportador de ácidos dicarboxílicos. Este malato es oxidado rápidamente por la malato deshidrogenasa mitocondrial para formar oxalacetato y NADH, que es oxidado por la cadena de transporte electrónico. El oxalacetato producido se convierte seguidamente en aspartato por la aspartato aminotransferasa mitocondrial ya que la membrana interna no contiene un transportador específico de oxalacetato. El aspartato puede entonces cruzar la membrana mediante el transportador de aspartato-glutamato hacia el citosol, en donde la aspartato aminotransferasa citosólica lo convierte en oxalacetato. A diferencia de la lanzadera de glicerol fosfato, la lanzadera del malato-aspartato es reversible y sirve como mecanismo para transportar equivalentes de reducción fuera de la matriz mitocondrial al citosol.

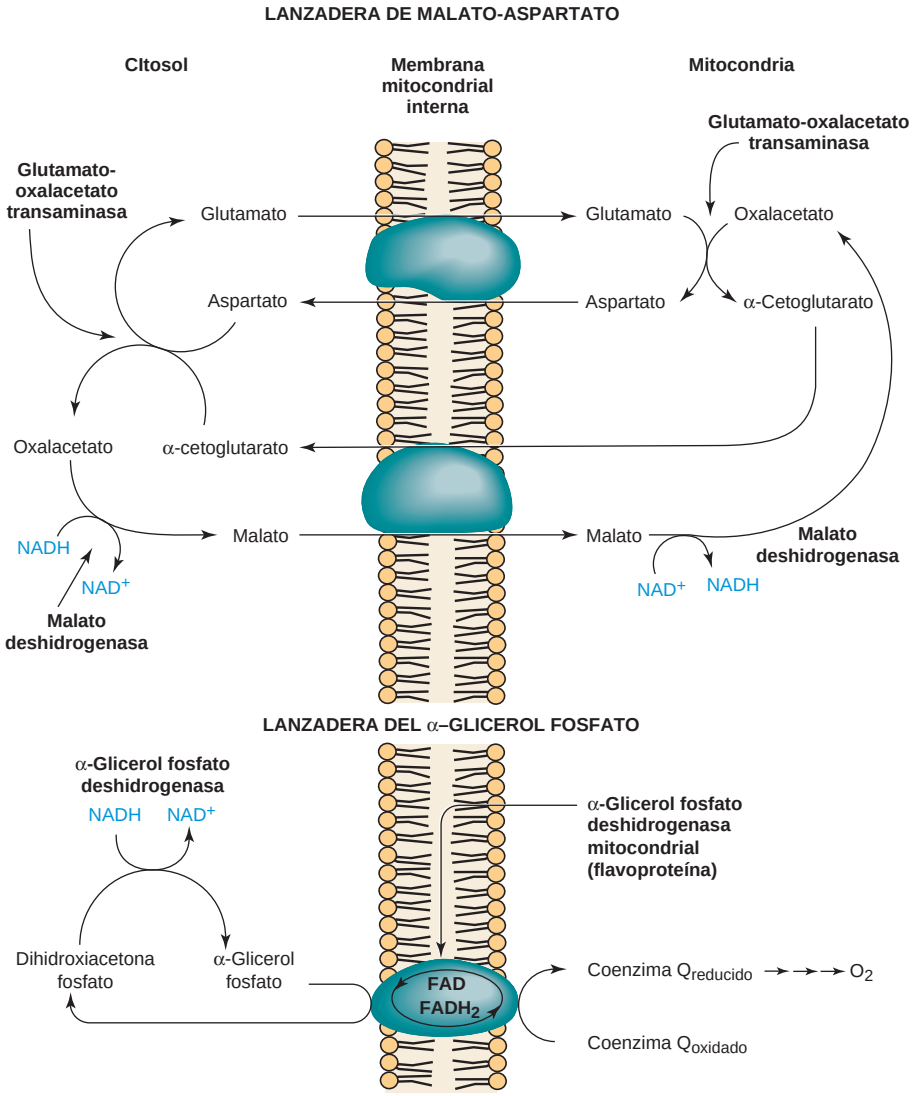


FIGURA 13.57
Lanzaderas para el transporte de equivalentes de reducción.

El citrato transporta unidades de acetilo

La membrana mitocondrial interna es impermeable al acetil CoA, pero se pueden transferir grupos acetilo desde el compartimiento mitocondrial al citosol, en donde los grupos acetilo son necesarios para la biosíntesis de ácidos grasos o esteroles (Figura 13.58). El acetil CoA intramitocondrial se convierte en citrato en la reacción de la citrato sintasa del ciclo TCA. Posteriormente, el citrato se exporta al citosol mediante un transportador de tricarboxilato, a cambio de un ácido dicarboxílico como, por ejemplo, el malato. El citrato citosólico se escinde a continuación formando acetil CoA y oxalacetato a expensas de una molécula de ATP en la reacción de la **ATP:citrato liasa** (véase p. 702). En el hígado existen mecanismos de lanzadera de sustrato que intervienen en el movimiento de sustratos adecuados e intermediarios en ambas direcciones, a través de la membrana mitocondrial interna durante períodos de gluconeogénesis y ureogénesis activa (véase p. 635).

La mitocondria posee un mecanismo específico de transporte de calcio

Las mitocondrias de la mayor parte de los tejidos de mamíferos poseen un sistema de transporte capaz de translocar calcio a través de la membrana interna. La distribución/redistribución de los pools celulares de calcio es de importancia crucial en

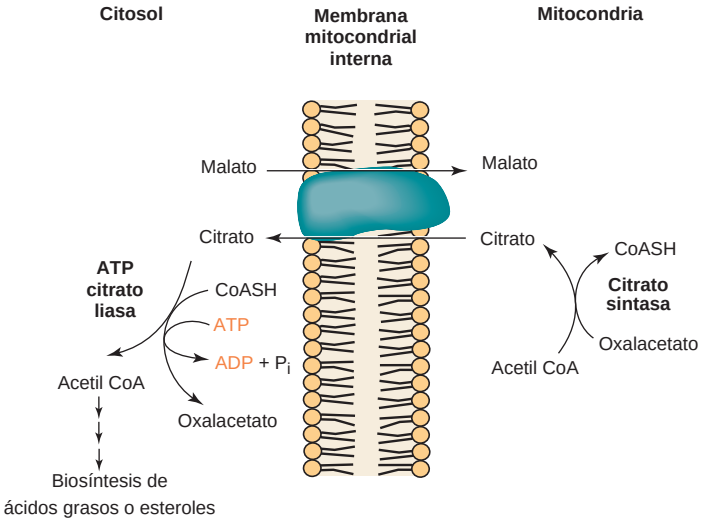


FIGURA 13.58
Exportación del citrato generado mitocondrialmente al citosol para actuar como fuente de acetil CoA para la biosíntesis de ácidos grasos o esteroles.

las diferentes funciones celulares, tales como la contracción muscular, la transmisión neuronal, la acción hormonal y la secreción. En el retículo endoplasmático (o retículo sarcoplasmático) se encuentran diversos pools de calcio con las concentraciones más elevadas pero también se han detectado pools de calcio en el citosol, mitocondria, núcleo y Golgi. Parte del calcio intracelular está unido a nucleótidos, metabolitos o ligandos de la membrana, mientras que una porción del calcio intracelular se halla libre en solución. Se calcula que el calcio citosólico intracelular se sitúa alrededor de 10^{-7} M, mientras que el calcio extracelular lo supera en al menos cuatro órdenes de magnitud. Las mitocondrias captan el calcio mediante un sistema uniport en la membrana interna que utiliza la energía del gradiente electroquímico (Figura 13.59). Estudios recientes mediante microscopia confocal de células vivas proporcionaron pruebas concluyentes de que las mitocondrias pueden intervenir en la regulación de la concentración intracelular de calcio. En las células las mitocondrias se localizan muy próximas tanto del retículo endoplasmático como del retículo sarcoplasmático. La fijación de hormonas a las membranas celulares da lugar a la liberación de inositol 3-fosfato (IP_3) a partir del fosfatidil inositol, cuya actuación produce la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático (véase p. 928). Los microdominios transitorios con elevada concentración de calcio que se producen dentro de las células se pueden modular mediante captación por las mitocondrias cercanas. En las mitocondrias el calcio regula las deshidrogenasas sensibles al calcio del ciclo TCA, al tiempo que también actúan eliminando calcio de áreas locales del citosol. De ahí que el secuestro y liberación de un depósito intracelular de calcio influya sobre los pools de calcio intracelular y sobre diversas funciones celulares. Una consecuencia de la elevada captación de calcio por las mitocondrias es la abertura de un poro en la membrana externa que lleva a la liberación de citocromo *c* con la consiguiente activación de la muerte celular por apoptosis o necrosis.

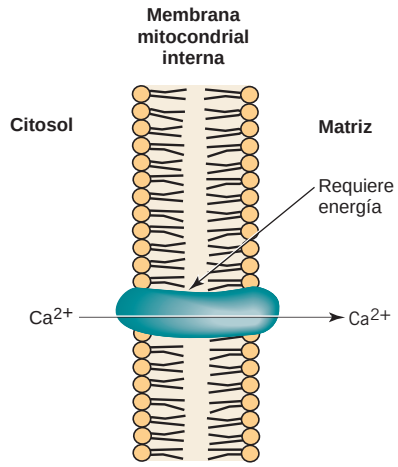


FIGURA 13.59
Transportador mitocondrial de calcio.

Proteínas desacopladoras

El **tejido adiposo marrón** juega un papel principal en la termogénesis sin estremecimientos de los recién nacidos, en los animales hibernantes y en animales de experimentación con termogénesis inducida por la dieta. El principal agente implicado en la termogénesis inducida por el frío en la grasa marrón es la **proteína desacopladora**, UCP-1, localizada exclusivamente en la membrana interna del tejido adiposo marrón. La UCP-1 transporta protones hacia el interior a través de la membrana mitocondrial interna y de este modo actúa desacoplando la síntesis de ATP del transporte electrónico (Figura 13.60). La termogénesis es el resultado de la activación de nervios simpáticos del cerebro en respuesta a la exposición al frío, con la consiguiente liberación de noradrenalina que se une a los receptores β-adrenér-

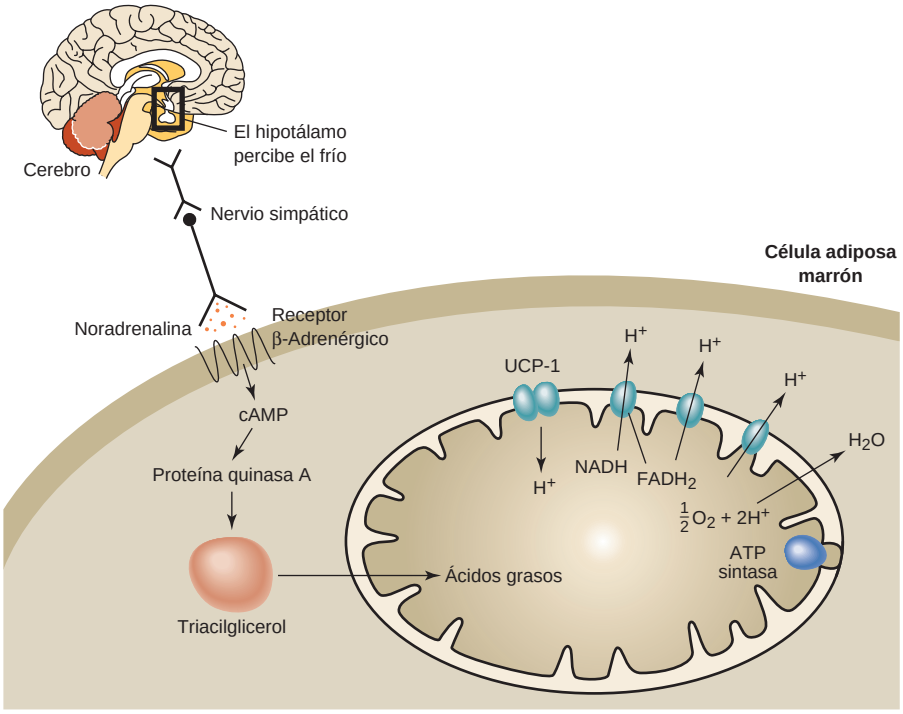


FIGURA 13.60
Activación de UCP-1 por adaptación al frío.
El frío estimula la liberación de noradrenalina por las células nerviosas simpáticas. La noradrenalina se une al receptor β-adrenérgico produciendo la activación de una lipasa con producción de ácidos grasos libres que activan la proteína conductora de protones UCP-1.

gicos de las membranas celulares de las células grasas marrones. La unión de la noradrenalina a los receptores β-adrenérgicos produce la liberación de cAMP y la activación de la proteína quinasa A, lo que da lugar a la estimulación de la lipólisis. La producción de ácidos grasos libres durante la lipólisis activa la UCP-1 para el transporte de protones hacia adentro a través de la membrana (Figura 13.60). Se cree que la estimulación del transporte de protones por los ácidos grasos libres es el resultado de la liberación de un protón del grupo carboxilo del ácido graso libre. La UCP-1 es un miembro de la familia de transportadores mitocondriales con características estructurales muy parecidas a la del translocador de nucleótidos de adenina, pero con un poro específico para el transporte de protones a la matriz. La estimulación crónica inducida por frío del receptor β-adrenérgico por la noradrenalina da lugar a un incremento en la transcripción del gen *UCP-1*, a la estimulación de la biogénesis mitocondrial y finalmente a la hiperplasia del tejido adiposo marrón. En grandes mamíferos, como por ejemplo los perros, gatos y primates (hombre incluido), que no hibernan, se encuentran depósitos discretos de grasa marrón en el nacimiento, pero se vuelven muy escasos durante el desarrollo posterior. Recientemente se han descubierto, en tejidos que no son el tejido adiposo marrón, otras cuatro proteínas desacopladoras, UCP-2, UCP-3, UCP-4 y UCP-5 con secuencias de aminoácidos similares a UCP-1. La presencia de proteínas desacopladoras en tejidos tales como el músculo esquelético ha incentivado la investigación sobre el posible papel de estas proteínas en la regulación del gasto de energía y, quizás, de la obesidad. Se ha sugerido el desarrollo de agentes farmacológicos potenciales que podrían afectar a las proteínas desacopladoras como un posible tratamiento de la obesidad.

13.9 GENES MITOCONDRIALES Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Las mitocondrias contienen su propio genoma, un DNA circular de doble hebra que contiene los genes estructurales de 13 proteínas de la cadena de transporte electró-

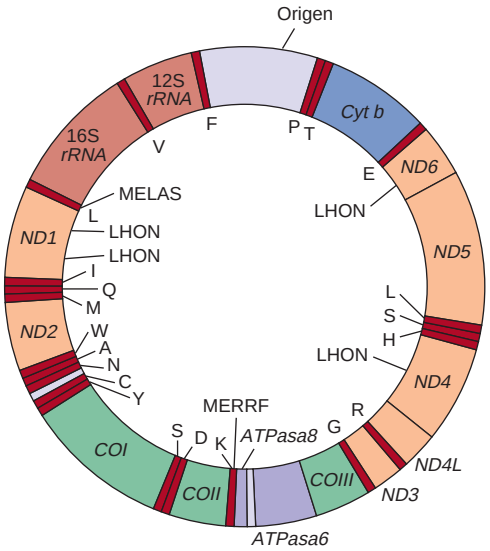


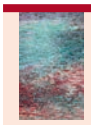
FIGURA 13.61
Mapa de los genes del DNA mitocondrial.

TABLA 13.8 Subunidades de los complejos del transporte electrónico codificadas por el DNA mitocondrial humano

Complejo		*Número total de subunidades*	*Número de subunidades codificadas por el DNA mitocondrial*
I	NADH–ubiquinona oxidorreductasa	>35	7
II	Succinato deshidrogenasa	4	0
III	Ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa	11	1
IV	Citocromo *c* oxidasa	13	3
V	ATP sintasa	12	2

nico entre las que se incluyen siete subunidades de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), una subunidad (citocromo *b*) de la ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa (complejo III), tres subunidades de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) y dos subunidades de la ATP sintasa (Tabla 13.8). Además, el DNA mitocondrial (mtDNA) contiene genes que codifican dos RNA ribosómicos (rRNA) más todos los RNA de transferencia (tRNA) necesarios que se requieren para la síntesis de proteínas en la mitocondria (véase Figura 13.61). Al tiempo que las mitocondrias pueden transcribir su propio DNA y traducir el mRNA correspondiente, las mitocondrias no son orgánulos autorreplicantes. Más del 90% de todas las proteínas mitocondriales están codificadas en el DNA nuclear, se sintetizan en el citosol y se importan al interior de la mitocondria en una etapa posterior.

Diversas enfermedades degenerativas del envejecimiento, entre ellas las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, se han atribuido a defectos mitocondriales. Diversas enfermedades son el resultado de mutaciones puntuales en el mtDNA que afectan a los tRNA o a uno de los genes estructurales. Otras enfermedades mitocondriales se deben a deleciones de grandes porciones de mtDNA. Una característica de todas las enfermedades mitocondriales es que se heredan invariablemente a través de la madre ya que, básicamente, todas las mitocondrias presentes en un huevo fertilizado provienen del óvulo. Generalmente, las enfermedades mitocondriales conducen a una menor actividad de la cadena de transporte electrónico y, en consecuencia, se acumulan piruvato y ácidos grasos, lo que conduce a acidosis láctica y acumulación de triacilgliceroles. Además, la velocidad de síntesis de ATP disminuye, lo que produce debilidad muscular e intolerancia al ejercicio. Véanse las Aplis. Clíns. 13.4, 13.5 y 13.6 para una discusión de enfermedades que resultan de tres tipos diferentes de mutaciones en el mtDNA.



APLICACIÓN CLÍNICA 13.4
Neuropatía óptica hereditaria de Leber

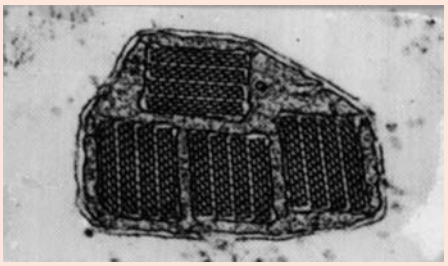
La primera enfermedad mitocondrial que se elucidó a nivel molecular fue la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON). Esta enfermedad, que se transmite por vía materna, afecta al sistema nervioso central, incluidos los nervios ópticos, y produce una ceguera de aparición repentina a principios de la edad adulta debido a la muerte del nervio óptico. En casi todas las familias, la LHON es el resultado del cambio de una única base en los genes mitocondriales del complejo I (ND1, ND4 y ND6), lo que conduce a una menor actividad de la NADH-ubiquinona oxidorreductasa (complejo I).

La gravedad de las enfermedades debidas a mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) depende del contenido de mtDNA mutado presente en una célula o tejido determinados. La presencia de cientos o miles de mitocondrias en cada célula permite porcentajes diferentes de mtDNA mutado en un tejido como consecuencia de la distribución al azar del mtDNA mutante en las células hijas durante la división celular. Cuanto más mtDNA mutante haya en un tejido, tanto mayores serán los efectos deletéreos sobre las funciones mitocondriales, especialmente la producción de energía. Un ejemplo es la LHON que resulta de una mutación puntual en el gen de la ND6 que sustituye una alanina conservada por una valina. Los pacientes con un menor porcentaje de mtDNA mutante desarrollan la ceguera de aparición repentina al principio de la edad adulta y otros síntomas típicos de la LHON. Los pacientes con un mayor porcentaje de mtDNA mutante que contienen la misma mutación desarrollan distonía, una enfermedad grave caracterizada por la aparición temprana de desorden motriz generalizado, deterioro del habla y retraso mental. Esto indica la dificultad de hacer generalizaciones acerca de enfermedades debidas a mutaciones específicas en el mtDNA.

Chalmers, R. M. y Schapira, A. H. V. Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1410:147, 1999.

APLICACIÓN CLÍNICA 13.5
Miopatías mitocondriales debidas a mutaciones en genes de tRNA

Mutaciones puntuales en genes que codifican tRNA mitocondriales dan lugar a dos de las enfermedades mitocondriales más frecuentes que se caracterizan por anomalías del sistema nervioso central así como miopatía mitocondrial con fibras rojas desgarradas, una asociación conocida como encefalomiopatía. Una mutación en el gen del tRNA de lisina produce la epilepsia mioclónica y fibras rojas desgarradas (MERRF, del inglés **m**yoclonic **e**pilepsy and **r**agged **r**ed **f**ibers). Entre los síntomas se cuentan mioclonía y ataxia con ataques generalizados y miopatía. Los músculos esqueléticos de los pacientes con MERRF tienen mitocondrias con formas anormales que contienen estructuras paracristalinas denominadas fibras rojas desgarradas (véase figura) y actividad citocromo *c* oxidasa disminuida.



Ejemplo de inclusiones paracristalinas en mitocondrias de músculos de pacientes con miopatía ocular (× 36 000).
Cortesía del Dr. D. N. Landon, Institute of Neurology, University of London.

La mutación en el gen mitocondrial del tRNA de leucina da lugar al más complejo de todos los defectos debidos al mtDNA: la mutación común MELAS que produce encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y una actividad tipo apoplejía. El músculo esquelético de los pacientes con MELAS tienen fibras rojas desgarradas pero retienen la actividad citocromo *c* oxidasa. La gravedad de los síntomas observados en pacientes con la mutación en el $tRNA^{Leu}$ varía con el porcentaje de DNA mitocondrial que contiene el gen de tRNA mutante. Los pacientes con >85% de genes mutantes presentan los síntomas del sistema nervioso central antes descritos más graves, mientras que los pacientes con 5-30% de genes mutantes a menudo padecen diabetes mellitus y sordera heredadas por vía materna. La consecuencia bioquímica de estas dos mutaciones del tRNA es la síntesis proteica mitocondrial deteriorada que lleva a actividades disminuidas del complejo I y de la citocromo *c* oxidasa. La explicación sobre los diferentes fenotipos de los individuos afectados con mutaciones similares constituye un reto que debe afrontar la comunidad que investiga sobre las mitocondrias.

Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482, 1999.

Otras mutaciones de genes mitocondriales conducen a una debilidad muscular progresiva, retinitis pigmentaria (pérdida de respuesta del retinal), pérdida auditiva y ataxia (acción muscular irregular), así como hipertrofia y deterioro del músculo cardíaco. Los efectos deletéreos del envejecimiento pueden ser también resultado de mutaciones acumuladas en el mtDNA a lo largo de la vida del individuo debido a la exposición constante a agentes lesivos para el DNA tales como los radicales de oxígeno.

APLICACIÓN CLÍNICA 13.6
Intolerancia al ejercicio en pacientes con mutaciones en el citocromo *b*

En 1993 se describió el primer caso de una mutación en el citocromo *b* que daba lugar a una actividad disminuida del complejo citocromo bc_1 en un hombre de 25 años que presentaba intolerancia al ejercicio. La mutación en el gen del citocromo *b* implicaba la sustitución de una glicina conservada en la posición 290 por un residuo aspartato. Posteriormente se demostró que pacientes con síntomas parecidos de intolerancia progresiva al ejercicio y debilidad con actividad del complejo bc_1 disminuida presentaban mutaciones en el gen del citocromo *b* con la sustitución de una glicina conservada en la posición 339 por un glutamato, y una glicina conservada en la posición 34 por una serina. Más recientemente se demostró que un paciente con cardiomiopatía hipertrófica grave tenía una mutación en el gen del citocromo *b* en el que una glicina conservada en la posición 166 era sustituida por un glutamato. Las mutaciones de glicina a aspartato y glutamato se localizaron en la proteína del citocromo *b* próxima al sitio Q_O para la oxidación del ubiquinol, mientras que la mutación de glicina a serina se localizaba cerca del sitio Q_i de reducción de la ubiquinona. Todas estas mutaciones del citocromo *b* implican un transición de guanina a adenina en el mtDNA, lo que sugiere que la mutación podría haber ocurrido por daño oxidativo. Además, en cada una de las mutaciones con sentido erróneo se reemplaza una glicina conservada por una molécula cargada mayor, lo que puede alterar de manera significativa la estructura del citocromo *b*, que lleva a una actividad catalítica menor, tal como se observó en el complejo bc_1. Se han identificado en el gen del citocromo *b* otras mutaciones sin sentido con la consecuencia de la síntesis de citocromo *b* truncado, así como mutaciones que implican deleciones de 4 a 24 pares de bases del mtDNA. Estas mutaciones sin sentido y de deleción conducen frecuentemente a intolerancia al ejercicio grave, acidosis láctica en estado de reposo y, ocasionalmente, mioglobinuria debida a la actividad disminuida del complejo bc_1. A diferencia de la mayoría de las mutaciones en el mtDNA, las mutaciones identificadas en el gen del citocromo *b* no se heredan por vía materna. Además, la mayoría de estas mutaciones sólo se expresan en tejidos musculares, lo que sugiere que las mutaciones identificadas en el gen del citocromo *b* son somáticas y tienen lugar durante la diferenciación en la capa germinal de las células madre miogénicas.

Andreu, A. L., et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome *b* gene of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 341:1037, 1999.

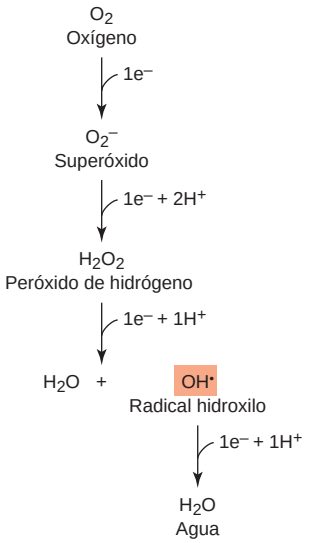


FIGURA 13.62
Etapas de un electrón en la reducción del oxígeno que conducen a la formación de las especies oxigenadas reactivas superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

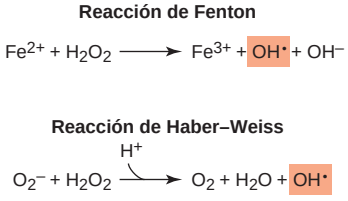


FIGURA 13.63
Reacciones de Fenton y de Haber-Weiss para la formación del radical tóxico hidroxilo.

13.10 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

El oxígeno es esencial para la vida. La mayoría de las oxidaciones intracelulares de sustratos tienen como resultado la transferencia de dos electrones a aceptores adecuados tales como el NAD^+ o el FAD, que se oxidan a continuación por la cadena de transporte electrónico. El paso final en el que se reduce el O_2 a agua está catalizada por la citocromo *c* oxidasa, que une fuertemente O_2 al centro binuclear en donde tiene lugar la reducción a pasos del O_2 sin liberación de intermedios en el proceso de oxidación (véase Sección 13.6 y p. 574). No obstante, la estructura electrónica del oxígeno favorece su reducción por adición de electrones de uno en uno, lo que conduce a la generación de **radicales de oxígeno** que pueden producir lesiones celulares. Un radical se define como una molécula con un electrón desapareado muy reactivo en un orbital exterior, que puede iniciar reacciones en cadena por eliminación de un electrón de otra molécula para completar su propio orbital. La transferencia a pasos de electrones al O_2 da lugar a la formación de los intermedios siguientes, tal como se indica en la Figura 13.62: a saber, **anión superóxido** (O_2^-), el parcialmente reducido **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) y el **radical hidroxilo libre** (OH•). De estos intermedios en la reducción del O_2 a agua, sin duda alguna el radical hidroxilo es el radical libre más peligroso ya que está implicado en reacciones tales como la peroxidación de lípidos y la generación de otros radicales tóxicos. El peróxido de hidrógeno no es por sí mismo un radical libre, pero se convierte, por medio de las reacciones de Fenton o de Haber-Weiss, en el radical hidroxilo en presencia de Fe^{2+} o Cu^+ prevalente en las células (véase Figura 13.63).

Producción de especies reactivas de oxígeno

Mientras que los procesos oxidativos de las células dan lugar generalmente a la transferencia de electrones al O_2 para formar agua sin liberación de intermedios, se forma inevitablemente un pequeño número de radicales oxigenados debido a pérdidas en las reacciones de transferencia de electrones. La fuente intracelular más importante de radicales oxigenados es la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en donde se produce superóxido por transferencia de un electrón al O_2 desde la semiquinona estable producida durante la reducción de la ubiquinona por los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico (Figura 13.64). Entre los radicales de oxígeno formados en la mitocondria se cuentan el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. También se producen especies oxigenadas tóxicas en los peroxisomas; allí se oxidan ácidos grasos y otros compuestos por transferencia de dos electrones desde el $FADH_2$ al O_2 con formación de peróxido de hidrógeno, el cual se convierte fácilmente en radical hidroxilo (Figura 13.63). El sistema del citocromo P450 localizado en el retículo endoplasmático también puede producir radicales oxigenados.

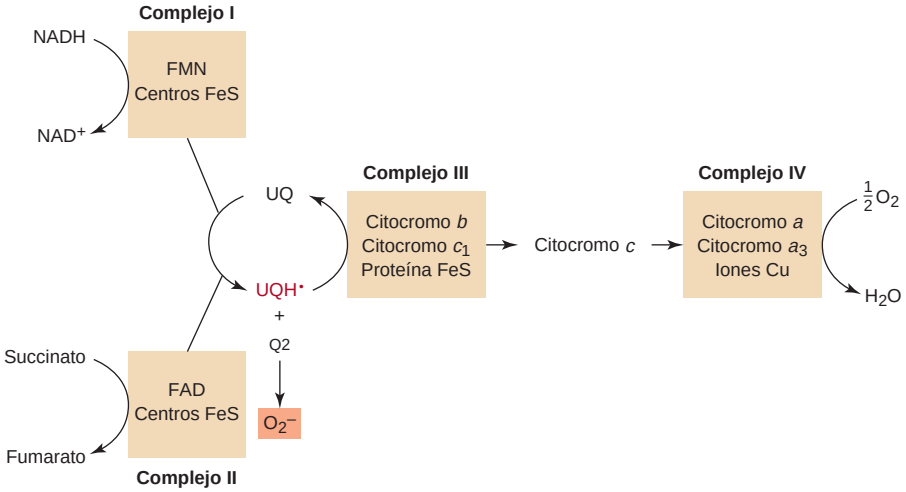


FIGURA 13.64
Generación de aniones superóxido por la cadena de transferencia electrónica mitocondrial.
La semiquinona estable formada durante la reducción mediante dos electrones de la ubiquinona por los centros hierro-azufre de los dos complejos, I y II, puede transferir un electrón al oxígeno para formar el anión superóxido. Por el contrario, el centro binuclear de la citocromo *c* oxidasa impide la liberación de intermedios en la reducción del oxígeno.

Los radicales de oxígeno también se producen en las células durante procesos tales como la inflamación producida por infección bacteriana. Para combatir las infecciones bacterianas, los fagocitos producen y liberan radicales oxigenados tóxicos para matar las bacterias invasoras en un proceso conocido como explosión respiratoria (*respiratory burst*). Los fagocitos (Figura 13.65) rodean las bacterias muertas. En una infección aguda, la producción de radicales oxigenados y la muerte de las bacterias son procesos eficientes; sin embargo, en las infecciones prolongadas, los fagocitos tienden a morir, liberando radicales oxigenados tóxicos que afectan a las células vecinas.

Además, la radiación cósmica, la ingestión de productos químicos y medicamentos, así como el "smog" pueden conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno. A menudo se producen lesiones por especies reactivas de oxígeno durante la perfusión de tejidos con soluciones que contienen altas concentraciones de O_2; este procedimiento se utiliza en pacientes que han sufrido un episodio isquémico en el que están reducidos los niveles locales de O_2 debido al bloqueo de una arteria (véase Apli. Clín. 13.7).

Lesiones producidas por especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno reaccionan con las principales clases de macromoléculas celulares causándoles lesiones. Los fosfolípidos presentes en las membranas plasmáticas y de orgánulos están sujetos a **peroxidación lipídica**, una reacción en cadena de radicales libres iniciada por la eliminación de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado por el radical hidroxilo. Los radicales lipídicos resultantes reaccionan a continuación con O_2 para formar radicales peróxido lipídicos y peróxido lipídico junto con malonildialdehído, que es hidrosoluble y se puede detectar en la sangre. Un ejemplo de los efectos de la peroxidación lipídica en el hombre son las manchas marrones que se observan frecuentemente en las manos de las personas ancianas. Estas manchas "de la edad" contienen el pigmento lipofuscina que se cree que es una mezcla de lípidos entrecruzados y productos de la peroxidación de lípidos que se acumula en los individuos a lo largo de los años. Una consecuencia significativa de la peroxidación lipídica es un aumento de la permeabilidad de las membranas a una afluencia de calcio y otros iones con la consiguiente hinchazón de la célula. Incrementos parecidos en la permeabilidad de las membranas de los orgánulos pueden dar lugar a una distribución incorrecta de iones con el resultado de lesión intracelular. Por ejemplo, la acumulación de cantidades excesivas de calcio en las mitocondrias puede desencadenar la apoptosis.

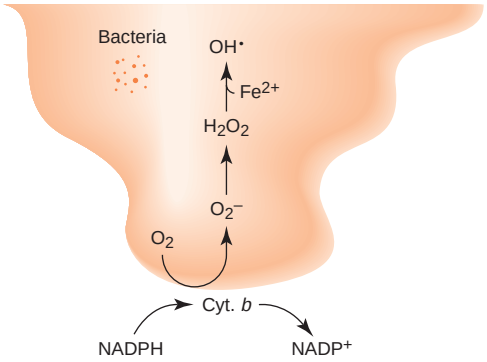
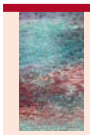


FIGURA 13.65
Explosión respiratoria en los fagocitos. Una cadena de transferencia electrónica en la que sólo interviene un citocromo *b* transfiere electrones desde el NADPH al oxígeno con formación de anión superóxido. El superóxido se convierte en radical hidroxilo que mata las bacterias que, posteriormente, son tragadas por los fagocitos.



APLICACIÓN CLÍNICA 13.7
Lesión isquemia/reperfusión

La oclusión de una de las arterias coronarias principales durante un infarto de miocardio produce isquemia o suministro reducido de oxígeno. En consecuencia, la cadena de transporte electrónico mitocondrial–fosforilación oxidativa queda inhibida y se produce una disminución de los niveles intracelulares de ATP y de creatina fosfato. A medida que disminuyen los niveles celulares de ATP se activa la glucólisis anaerobia, en un intento de mantener las funciones celulares normales. Los niveles de glucógeno se agotan rápidamente y aumentan los niveles de ácido láctico en el citosol, disminuyendo el pH intracelular. A pesar de las consecuencias directas de la isquemia, el daño a los tejidos afectados parece aumentar cuando se reintroduce (o reperfunde) oxígeno y se forman radicales de oxígeno, incluidos el superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (OH•). Un estudio reciente observó la formación de radicales oxigenados, incluido el peroxinitrito ($ONOO^-$), producido a partir del óxido nítrico (NO) y superóxido durante la reperfusión aguda del corazón isquémico. Se ha demostrado que el peroxinitrito contribuye a la deficiente recuperación de la función mecánica del corazón isquémico, mientras que antioxidantes tales como el glutatión, que elimina los radicales peroxinitrito, protege contra el daño a la función mecánica. La reperfusión del corazón isquémico también puede conducir a la activación de leucocitos, que actúan de intermediarios en el proceso inflamatorio y conducen a una mayor lesión tisular.

La isquemia/reperfusión del miocardio representa un problema clínico asociado con la trombólisis, angioplastia y cirugía de bypass coronario. Entre las lesiones del miocardio debidas a la isquemia/reperfusión se cuentan la disfunción contráctil cardíaca, arritmias y lesión miocítica irreversible. La isquemia también puede aparecer durante la cirugía, especialmente durante el transplante de tejidos. El papel postulado para los radicales oxigenados en la lesión isquemia/reperfusión se refuerza por la observación de que los antioxidantes protegen de la lesión por reperfusión del tejido isquémico. Actualmente están en marcha investigaciones activas de métodos para proteger de la lesión por reperfusión utilizando modelos animales en los que se exploran los efectos de la administración de antioxidantes y en la prevención de la generación de radicales oxigenados. El incremento en el uso de procedimientos invasivos utilizados en medicina clínica indica la importancia de desarrollar métodos que protejan contra la lesión isquemia/reperfusión.

Cheung, P. Y., Wang, W. y Schulz, R. Glutathione protects against myocardial ischemia–reperfusion injury by detoxifying peroxynitrite. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:1669, 2000.

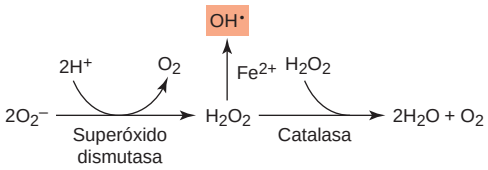


FIGURA 13.66
Los enzimas superóxido dismutasa y catalasa protegen las células al eliminar el superóxido y el peróxido de hidrógeno.

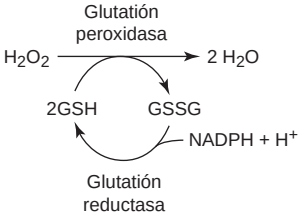


FIGURA 13.67
La glutatión peroxidasa elimina el peróxido de hidrógeno así como los peróxidos de lípidos.
Se transfieren electrones al peróxido de hidrógeno desde los grupos sulfhidrilo del glutatión reducido (GSH) con formación de glutatión oxidado (GSSG). A continuación la glutatión reductasa reduce el GSSG a GSH utilizando NADPH como agente reductor.

Prolina, histidina, arginina, cisteína y metionina son susceptibles al ataque por radicales hidroxilo con la consiguiente fragmentación de las proteínas, entrecruzamiento y agregación. Las proteínas que han sufrido daños debido al ataque de radicales oxigenados pueden estar sujetas a velocidades de digestión más elevadas por proteasas intracelulares.

Sin duda, la consecuencia más importante de los radicales oxigenados es la lesión tanto del DNA nuclear como mitocondrial que da lugar a mutaciones. La fijación no específica de iones ferrosos (Fe^{2+}) al DNA puede dar lugar a la formación de radicales hidroxilo que atacan bases individuales produciendo roturas de las hebras. El DNA mitocondrial es más susceptible a la lesión por radicales oxigenados, ya que la cadena de transporte electrónico es una fuente principal de radicales de oxígeno tóxicos. El DNA nuclear está protegido de las lesiones permanentes por una capa protectora de histonas, así como por mecanismos activos y eficientes para la reparación del DNA. Las lesiones en el mtDNA dan lugar generalmente a mutaciones que afectan a la producción de energía. Los síntomas en los individuos afectados se manifiestan en los procesos que requieren energía tales como la contracción muscular. En la Apli. Clín. 13.7 se presenta un ejemplo de las consecuencias de una mutación somática en el gen mitocondrial del citocromo *b* que puede haber sido provocada por radicales de oxígeno.

Defensas celulares contra las especies oxigenadas reactivas

Las células que viven en un ambiente aeróbico han desarrollado múltiples maneras de eliminar las especies reactivas oxigenadas para protegerse contra los efectos perjudiciales de estos radicales. Los mamíferos tienen tres isozimas diferentes de **superóxido dismutasa** que catalizan la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno (Figura 13.66). La forma citosólica de la superóxido dismutasa contiene Cu/Zn en su sitio activo, al igual que el enzima extracelular; sin embargo, existe una forma mitocondrial única de superóxido dismutasa que contiene Mn en su sitio activo. La importancia de la eliminación del superóxido en las células se pone de relieve por la presencia de estas tres formas de superóxido dismutasa en diferentes compartimientos celulares. El peróxido de hidrógeno es eliminado por la catalasa, enzima que contiene un grupo hemo y que está presente a concentraciones elevadas en los peroxisomas, y en menor cantidad en las mitocondrias y en el citosol (Figura 13.66).

Un mecanismo principal para la protección contra los daños causados por los radicales oxigenados es la **glutatión peroxidasa**, que cataliza la reducción tanto del peróxido de hidrógeno como de los peróxidos lipídicos (Figura 13.67). Este enzima que contiene selenio utiliza los grupos sulfhidrilo del glutatión (GSH) como dadores de hidrógeno con formación de la forma oxidada disulfuro del glutatión (GSSG). La **glutatión reductasa** convierte de nuevo la forma disulfuro del glutatión a la forma sulfhidrilo utilizando el NADPH formado en la ruta de las pentosas fosfato como dador de electrones. También se puede conseguir una protección contra las especies reactivas oxigenadas mediante la ingestión de captadores de oxígeno tales como las vitaminas C y E y el β-caroteno.

BIBLIOGRAFÍA

Sistemas productores y consumidores de energía

Atkinson, D. E. *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*. New York: Academic Press, 1977.

Bock, R. M. Adenine nucleotides and properties of pyrophosphate compounds. En: P. D. Boyer, H. Lardy y K. Myrback (Eds.), *The enzymes*, 2nd ed., Vol. 2. New York: Academic Press, 1960, p. 3.

Hanson, R. W. The role of ATP in metabolism. *Biochem. Educ.* 17:86, 1989.

Lipmann, F. Metabolic generation and utilization of phosphate bound energy. *Adv. Enzymol.* 1:99, 1941.

Fuentes y destinos del acetil CoA

Behal, R. H., Buxton, D. B., Robertson, J. G. y Olson, M. S. Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex, *Annu. Rev. Nutr.* 13:497, 1993.

Reed, L. J. y Hackert, M. L. Structure–function relationships in dihydrolipoamide acyl transferases. *J. Biol. Chem.* 265:8971, 1990.

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Hansford, R. G. Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr. Topics Bioenerg.* 10:217, 1980.

Krebs, H. A. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14:154, 1970.

Kornberg, H. L. Tricarboxylic acid cycles, *BioEssays* 7:236, 1987.

Hajnoczky, G., Csordas, G., Krishnamurthy, R. y Szalai, G. Mitochondrial calcium signaling driven by the IP_3 receptor. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32:15, 2000.

Ovadi, J. y Srere, P. A. Macromolecular compartmentation and channeling. *Int. Rev. Cytol.* 192:255, 2000.

Patel, M. S. y Harris, R. A. Mammalian α-keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects. *FASEB J.* 9:1164, 1995.
Williamson, J. R. y Copper, R. V. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett.* 117 (Suppl.), K73, 1980.

Estructura y compartimentación de las membranas mitocondriales

Ernster, L. (Ed.) *Bioenergetics*. Amsterdam: Elsevier, 1984.
Tzagoloff, A. *Mitochondria*. New York: Plenum Press, 1982.

Transporte de electrones

Babcock, G. T. y Wickstrom, M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356:301, 1992.
Berry, E. A., Huang, L. S., Zhang, Z. y Kim, S. H. Structure of the avian mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31:177, 1999.
Calhoun, M. W., Thomas, J. W. y Gennis, R. B. The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochem. Sci*. 19:325, 1994.
Iwata, M., Bjorkman, J. y Iwata, S. Conformational change of the Rieske [2Fe2S] protein in cytochrome bc_1 complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31:169, 1999.
Trumpower, B. L. y Gennis, R. B. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration. *Annu. Rev. Biochem*. 63:675, 1994.
Xia, D., et al. Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277:60, 1997.

Fosforilación oxidativa

Boyer, P. D. The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66:717, 1997.
Cramer, W. A. y Knaff, B. A. *Energy Transduction in Biological Membranes. A Textbook of Bioenergetics.* New York: Springer-Verlag, 1990.
Mitchell, P. Vectorial chemistry and the molecular mechanism of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. *Biochem. Soc. Trans*. 4:398, 1976.
Sambongi, Y., et al. Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F_0F_1): direct observation. *Science* 286:1722, 1999.
Saraste, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283:1488, 1999.
Stock, D., Leslie, A. G. W. y Walker, J. E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286:1700, 1999.

Sistemas de transporte mitocondriales

Klingenberg, M. Structure–function of the ADP/ATP carrier. *Biochem. Soc. Trans.* 20:547, 1992
Klingenberg, M., Winkler, E. y Huang, S. ADP/ATP carrier and uncoupling protein. *Methods Enzymol.* 260:369, 1995.
LaNoue, K. F. y Schoolwerth, A. C. Metabolite transport in mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 48:871, 1979.

Genes y enfermedades mitocondriales

DiMauro, S., Bonilla, E., Davidson, M., Hiran, M. L. y Schon, E. A. Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1366:199, 1998.
Morgan-Hughes, J. A. y Hanna, M. G. Mitochondrial encephalomyopathies: the enigma of genotype versus phenotype. *Biochim. Biophys. Acta* 1410:125, 1999.
Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in mice and man. *Science* 283:1482, 1999.

Especies reactivas de oxígeno

Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97, 1995.
Hansford, R., Tsuchiya, N. y Pepe, S. Mitochondria in heart ischaemia and aging. *Biochem. Soc. Symp.* 66:141, 1999.
Sohal, R. S. Mitochondria generate superoxide anion radicals and hydrogen peroxide. *FASEB J.* 11:1269, 1997.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Un enlace puede ser "rico en energía" por cualquiera de las siguientes razones, EXCEPTO:
   A. los productos de su rotura están más estabilizados por resonancia que el compuesto original.
   B. el enlace es excepcionalmente estable y su rotura necesita un gran aporte de energía.
   C. cuando el enlace se rompe desaparece la repulsión electrostática.
   D. uno de los productos de rotura puede ser inestable y se tautomeriza a una forma más estable.
   E. el enlace puede estar tensionado.

2. ¿En cuál de los siguientes pasos catalizados enzimáticamente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se incorporan los elementos del agua a un intermediario del ciclo?
   A. aconitasa.
   B. citrato sintasa.
   C. malato deshidrogenasa.
   D. succinato deshidrogenasa.
   E. succinil CoA sintasa.

3. Los siguientes intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos pueden ser suministrados o eliminados por otras rutas metabólicas EXCEPTO:
   A. citrato.
   B. fumarato.
   C. isocitrato.
   D. α-cetoglutarato.
   E. oxalacetato.

4. La regulación de la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos *in vivo* podría implicar la concentración de los siguientes compuestos EXCEPTO:
   A. acetil CoA.
   B. ADP.
   C. ATP.
   D. CoA.
   E. oxígeno.

5. La membrana mitocondrial contiene un transportador para:
   A. NADH.
   B. acetil CoA.
   C. GTP.
   D. ATP.
   E. NADPH.

6. Cuando se añade rotenona a la cadena de transporte electrónico mitocondrial:
   A. la relación P/O del NADH se reduce de 3/1 a 2/1.
   B. la velocidad de oxidación de NADH disminuye a 2/3 partes de su valor inicial.
   C. la oxidación del succinato permanece normal.
   D. la fosforilación oxidativa se desacopla en el complejo I.
   E. el flujo electrónico se inhibe en el complejo II.

7. Si se añade cianuro a mitocondrias estrechamente acopladas que oxidan activamente succinato:
   A. la posterior adición de 2,4-dinitrofenol provoca la hidrólisis de ATP.

B. la posterior adición de 2,4-dinitrofenol restaura la oxidación de succinato.
C. cesa el flujo de electrones, pero continúa la síntesis de ATP.
D. cesa el flujo de electrones, si bien la síntesis de ATP puede restaurarse por adición de 2,4-dinitrofenol.
E. la posterior adición de 2,4-dinitrofenol y del inhibidor de la fosforilación, oligomicina, provoca la hidrólisis de ATP.

8. ¿En cuál de las siguientes proteínas el hierro del hemo está unido a la misma por un único enlace de coordinación?
A. citocromo *a*.
B. citocromo a_3.
C. citocromo *b*.
D. citocromo *c*.
E. ninguna de las anteriores.

9. El cobre es un componente esencial que participa en la transferencia de electrones de:
A. complejo I
B. complejo II
C. complejo III
D. complejo IV
E. todos los anteriores

10. En la hipótesis quimiosmótica está involucrado lo siguiente EXCEPTO:
A. una membrana impermeable a los protones.
B. el transporte electrónico por la cadena respiratoria bombea protones fuera de la mitocondria.
C. el flujo de protones al interior de las mitocondrias depende de la presencia de ADP y fósforo inorgánico.
D. la actividad ATPasa es reversible.
E. solamente el transporte de protones está estrictamente regulado; otros iones cargados positivamente pueden difundir libremente a través de la membrana mitocondrial.

Preguntas 11 y 12: Un niño presentaba defectos neurológicos graves. Pruebas sanguíneas indicaron niveles séricos elevados de lactato, piruvato y alanina. Cultivos de fibroblastos de la piel mostraron una baja actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Estudios posteriores podrían indicar qué subunidad del complejo es defectuosa, aunque los efectos metabólicos son básicamente los mismos independientemente de cuál es la subunidad defectuosa.

11. La forma activa de la piruvato deshidrogenasa está favorecida por la influencia de todos los siguientes factores sobre la piruvato deshidrogenasa quinasa EXCEPTO:
A. baja [Ca^{2+}].
B. relación acetil CoA/CoASH baja.
C. elevada [piruvato].
D. relación NADH/NAD^+ baja.

12. Suponga que el defecto específico fuera una piruvato deshidrogenasa (primera subunidad catalítica) mutante con una débil fijación de su grupo prostético. En este tipo de defecto, a veces es útil incrementar mucho el precursor en la dieta del grupo prostético. En este caso, ¿cuál de los siguientes compuestos sería útil incrementar?
A. ácido lipoico
B. nicotinamida (parte del NAD)
C. ácido pantoténico (parte del CoA)
D. riboflavina (parte del FAD)
E. tiamina (parte del TPP)

Preguntas 13 y 14: Cuando está bloqueada una arteria coronaria principal se produce una isquemia (suministro de oxígeno disminuido) que inhibe el transporte electrónico mitocondrial y la fosforilación oxidativa. La isquemia produce lesiones en los tejidos afectados. Sin embargo, la reperfusión (introducción de oxígeno) parece causar aún mayor daño tisular ya que se forman radicales oxigenados. Una cierta esperanza de minimizar las lesiones por reperfusión se basan en la administración de antioxidantes.

13. Todas las frases siguientes son correctas, EXCEPTO:
A. las especies reactivas de oxígeno (radicales de oxígeno) se producen cuando hay una adición concertada de cuatro electrones a la vez al O_2.
B. el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH•) son dos formas de oxígeno reactivo.
C. la superóxido dismutasa es un enzima natural que protege contra las lesiones al convertir O_2^- en H_2O_2.
D. las especies reactivas de oxígeno dañan los fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos.
E. el glutatión protege contra el H_2O_2 al reducirlo a agua.

14. Todo lo que sigue es resultado de la isquemia EXCEPTO:
A. disminución del ATP intracelular.
B. disminución de la creatina fosfato intracelular.
C. disminución de NADH/NAD^+.
D. acidosis láctica.
E. eliminación del glucógeno celular.

Problemas

15. Para la reacción A $\rightleftharpoons$ B, $\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}1$ kcal mol^{-1}. A 37°C, $-2{,}303\ RT = -1{,}42$ kcal mol^{-1}. ¿Cuál es la razón B/A en el equilibrio?

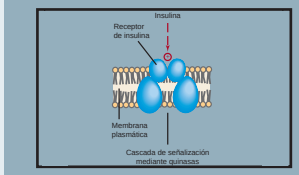
16. Si a través de la reacción de la piruvato deshidrogenasa y del TCA se utiliza piruvato marcado con ^{14}C, ¿dónde se encontraría la marca de carbono al final de una vuelta del ciclo TCA? ¿Dónde se encontraría el carbono marcado al final de la segunda vuelta del ciclo?

RESPUESTAS

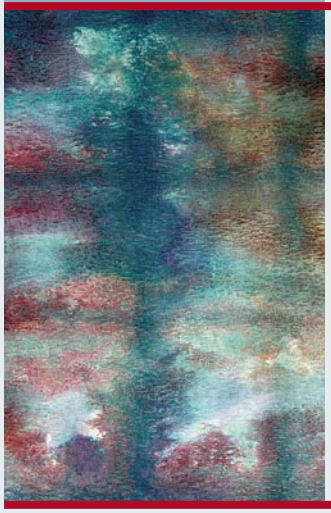
1. **B** Alta energía no se refiere a una elevada energía de formación (estabilidad de enlace). Un enlace se denomina "rico en energía" cuando posee una alta energía de hidrólisis, lo cual puede deberse a las razones de A, C, D o E.
2. **B** Se requiere agua para hidrolizar el enlace tioéster del acetil CoA. A: La aconitasa elimina y después adiciona agua. C y D: Las deshidrogenasas eliminan dos protones y dos electrones. E: Aquí el enlace tioéster es fosforilado, no hidrolizado; el fosfato es posteriormente transferido desde el intermediario succinil fosfato al GDP.
3. **C** A: El citrato es transportado fuera de la mitocondria para ser utilizado como fuente de acetil CoA citoplasmático. B: El fumarato se produce durante la degradación de la fenilalanina y de la tirosina. D puede formarse a partir de glutamato. E: El oxalacetato es producido por la piruvato carboxilasa y utilizado en la gluconeogénesis. Claramente, la mayoría de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos desempeñan múltiples papeles en el organismo.
4. **D** El CoA no es un regulador, si bien se admite que a corto plazo hay una relación recíproca entre las concentraciones de CoA

y acetil CoA. A es el sustrato. B activa a la isocitrato deshidrogenasa y C la inhibe. E: El ciclo requiere oxígeno para oxidar el NADH y el ADP, y convertirlos en ATP (control respiratorio)

5. **D** ATP y ADP se transportan en direcciones opuestas. A,B: los equivalentes de reducción procedentes del NADH se transportan por lanzadera a través de la membrana, lo mismo que el grupo acetilo del acetil CoA, pero el NADH y el acetil CoA por sí mismos no pueden atravesarla. C: De los nucleótidos sólo se transportan el ATP y el ADP. E: Al igual que el NADH, el NADPH no cruza la membrana.
6. **C** La rotenona inhibe a nivel de la NADH deshidrogenasa (sitio I), e impide todo flujo electrónico y toda síntesis de ATP a partir de NADH. Las deshidrogenasas ligadas a flavina suministran electrones por debajo del sitio I y no son afectadas por los inhibidores de dicho sitio.
7. **A** El cianuro inhibe el transporte electrónico en el sitio III y bloquea el flujo de electrones por todo el sistema. En mitocondrias acopladas también cesa la síntesis de ATP. La adición de un desacoplador permite a la ATPasa mitocondrial (que normalmente trabaja en la dirección de síntesis) ponerse en funcionamiento y catalizar la reacción favorable de hidrólisis del ATP, a menos que sea inhibida por un inhibidor de la fosforilación tal como la oligomicina.
8. **B** El Fe^{2+} tiene seis posiciones de coordinación. En el hemo cuatro de ellas son satisfechas por el anillo porfirínico. En los citocromos *a*, *b* y *c* las dos restantes las aporta la proteína, pero en el citocromo a_3 una posición debe quedar libre como sitio de unión de oxígeno.
9. **D** El cobre está implicado directamente en la reacción del citocromo a_3 con el O_2. A-C: Estos complejos contienen proteína con agrupamientos Fe-S pero no contienen cobre.
10. **E** Si la separación de carga pudiera disiparse mediante la difusión libre de otros iones, la energía se perdería y no se produciría síntesis de ATP.
11. **A** Una elevada $[Ca^{2+}]$ favorece la forma activa de la deshidrogenasa, pero por activación de la fosfatasa. B-D: tanto el NADH como el acetil CoA activan la piruvato deshidrogenasa quinasa y, por tanto, inactivan la piruvato deshidrogenasa. El piruvato inhibe la quinasa, por lo que favorece la forma activa de la deshidrogenasa.
12. **E** El TPP es el cofactor de la primera reacción, la cual descarboxila el piruvato. A, C: Estos son cofactores de la dihidrolipoil transacetilasa. B, D: Estos son cofactores de la dihidrolipoil deshidrogenasa.
13. **A** La transferencia de cuatro electrones al oxígeno produce agua. Los radicales de oxígeno se producen cuando los electrones se añaden paso a paso al O_2. B: H_2O_2 también se incluye como oxígeno reactivo porque puede producir OH•. C: El H_2O_2 se degrada seguidamente por la catalasa. D: Todos ellos están sujetos a oxidación con efectos nocivos. E: La glutatión peroxidasa cataliza esta reacción.
14. **C** La inhibición del transporte electrónico debido a baja concentración de O_2 impide la reoxidación del NADH, con lo que aumenta $NADH/NAD^+$. A, B: El ATP disminuye debido a que la fosforilación oxidativa está inhibida. Esto desplaza la reacción de la creatina quinasa hacia el ATP. D: La glucólisis anaeróbica está estimulada para proporcionar ATP, lo que lleva a un incremento del lactato. E: El glucógeno es el sustrato de la glucólisis anaeróbica.
15. $\Delta G^{o\prime} = -RT \ln K'_{eq} = -2{,}303\ RT \log K'_{eq}$. Sustituyendo da $\log K'_{eq} = 5$. K'_{eq}. Por tanto K'_{eq} es 100 000 de manera que B/A = 100 000/1.
16. El carbono ceto marcado del piruvato se transforma en el carbono carboxílico del acetil CoA. Después de condensación con el oxalacetato se marca el primer grupo carboxilo del citrato. Esta marca se mantiene a través de las reacciones posteriores hasta el succinato. Sin embargo, el succinato es un compuesto simétrico para el enzima por lo que, de hecho, están marcados los dos grupos carboxilo del succinato. Esto significa que el oxalacetato regenerado está marcado en los dos grupos carboxilo al final de una vuelta (de hecho, la mitad de las moléculas están marcadas en un carboxilo y la mitad en el otro, si bien esto no se puede distinguir de manera experimental). Obsérvese que el CO_2 no está marcado. En la segunda vuelta se añade acetil CoA marcado en el mismo carboxilo, pero esta vez al oxalacetato marcado. Los dos grupos carboxilo del oxalacetato se liberan en forma de CO_2, por lo que éste estará marcado lo mismo que el oxalacetato que se regenera.



14



METABOLISMO GLUCÍDICO I: PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS Y SU CONTROL

Robert A. Harris

14.1 VISIÓN GENERAL 598

14.2 GLUCÓLISIS 599

La glucólisis tiene lugar en todas las células humanas 599
La glucosa se metaboliza de forma diferente en diversas células 600

14.3 RUTA GLUCOLÍTICA 603

La glucólisis tiene lugar en tres fases 603
La primera fase ceba la molécula de glucosa 605
La segunda fase consiste en la partición de un intermedio fosforilado 605
En la tercera fase tienen lugar reacciones de oxidorreducción y la síntesis de ATP 606
Rendimiento en ATP y ecuación igualada de la glucólisis anaeróbica 609
El NADH generado durante la glucólisis se ha de reoxidar a NAD^+: papel de la lactato deshidrogenasa 609
El NADH que se genera durante la glucólisis puede reoxidarse a través de sistemas de lanzadera de sustrato 610
Las lanzaderas son importantes en otras rutas oxidorreductoras 611
Oxidación del alcohol 611
Formación de glucurónido 611
Las dos rutas de lanzadera proporcionan diferentes cantidades de ATP 612
La glucólisis es inhibida por reactivos de grupo sulfhidrilo y por el fluoruro 613
El arseniato impide la síntesis de ATP pero no inhibe la glucólisis 613

14.4 REGULACIÓN DE LA RUTA GLUCOLÍTICA 614

La hexoquinasa y la glucoquinasa tienen propiedades diferentes 615
La 6-fosfofructo-1-quinasa es un sitio regulador importante en la glucólisis 618
Regulación de la 6-fosfofructo-1-quinasa por el ATP y el AMP 619
El pH intracelular puede regular la 6-fosfofructo-1-quinasa 620
Los niveles intracelulares de citrato regulan la 6-fosfofructo-1-quinasa 622
Control hormonal de la 6-fosfofructo-1-quinasa por cAMP y fructosa 2,6-bisfosfato 622
El cAMP activa la proteína quinasa A 624
La 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa está regulada por fosforilación–desfosforilación 624
El corazón contiene un isozima diferente del enzima bifuncional 626
La piruvato quinasa es un enzima de la glucólisis sujeto a regulación 628

14.5 GLUCONEOGÉNESIS 629

La síntesis de glucosa es necesaria para la supervivencia 629
Ciclos de Cori y de la alanina 629
Síntesis de la glucosa a partir del lactato 631
La gluconeogénesis utiliza muchos de los enzimas glucolíticos, pero en dirección inversa 633
La glucosa se sintetiza a partir de la cadena carbonada de algunos aminoácidos 634
La glucosa se puede sintetizar a partir de ácidos grasos de cadena impar 636
La glucosa se sintetiza a partir de otros azúcares 637
Fructosa 637
Galactosa 638
La gluconeogénesis requiere gasto de ATP 638
La gluconeogénesis tiene varios puntos de regulación 639
El control hormonal de la gluconeogénesis es crítico para la homeostasis 641
La ingestión de etanol inhibe la gluconeogénesis 642

14.6 GLUCOGENÓLISIS Y GLUCOGENOGÉNESIS 643

Se utiliza glucógeno, forma de almacenamiento de la glucosa, como fuente rápida de energía 643

La glucógeno fosforilasa cataliza el primer paso de la degradación del glucógeno 644
Se necesita un enzima desramificante para completar la hidrólisis del glucógeno 648
La síntesis del glucógeno precisa enzimas específicos 649
Glucógeno sintasa 649
Aspectos especiales de la degradación y síntesis del glucógeno 651
¿Por qué almacenar glucosa en forma de glucógeno? 651
La glucogenina es necesaria como cebador de la síntesis de glucógeno 651
El glucógeno limita su propia síntesis 652
La síntesis y degradación del glucógeno son rutas altamente reguladas 652
Regulación de la glucógeno fosforilasa 652
La cascada que regula la glucógeno fosforilasa amplifica una señal pequeña produciendo un efecto muy grande 654
Regulación de la glucógeno sintasa 654
Regulación de las fosfoproteína fosfatasas 655
Control por efector del metabolismo del glucógeno 656
El glucógeno controla por retroinhibición su propia síntesis 657
La fosforilasa a funciona como un "receptor de glucosa" en el hígado 657
El glucagón estimula la degradación de glucógeno en el hígado 658
La adrenalina estimula la degradación del glucógeno en el hígado 658
La adrenalina estimula la degradación de glucógeno en el corazón y el músculo esquelético 659
Control neural de la degradación de glucógeno en el músculo esquelético 659
La insulina estimula la síntesis de glucógeno en el músculo y en el hígado 660

BIBLIOGRAFÍA 661

PREGUNTAS Y RESPUESTAS 662

APLICACIONES CLÍNICAS

14.1 Alcohol y barbitúricos 612
14.2 Envenenamiento por arsénico 614
14.3 Intolerancia a la fructosa 616
14.4 Diabetes mellitus 618
14.5 Acidosis láctica 621
14.6 Cerdo en escabeche e hipertermia maligna 621
14.7 Angina de pecho e infarto de miocardio 622
14.8 Anemia hemolítica por déficit de piruvato quinasa 628
14.9 Hipoglucemia y niños prematuros 629
14.10 Hipoglucemia e intoxicación alcohólica 643
14.11 Enfermedades de almacenamiento del glucógeno 647

14.1 | VISIÓN GENERAL

Las principales rutas del metabolismo glucídico empiezan o terminan en la glucosa (Figura 14.1). Este capítulo describe la utilización de glucosa como fuente de energía, la formación de glucosa a partir de precursores no glucídicos, el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno para su utilización posterior y la liberación de glucosa desde el glucógeno para su utilización por las células. El conocimiento profundo de estas vías y su regulación metabólica es necesario debido al importante papel que desempeña la glucosa en el cuerpo. La glucosa es la forma principal en la que los glúcidos que provienen del tracto intestinal son presentados al resto de las células corporales. La glucosa es el único combustible utilizado en proporción apreciable por unas pocas células especializadas, y es el principal combustible utilizado por el cerebro. La glucosa es, en efecto, tan importante para estas células especializadas y para el cerebro que varios de los principales tejidos del cuerpo trabajan conjuntamente para asegurar un suministro continuo de este sustrato esencial. El metabolismo de la glucosa es defectuoso en dos enfermedades metabólicas muy importantes, la obesidad y la diabetes, las cuales, a su vez, son factores que contribuyen al desarrollo de una serie de problemas médicos importantes, entre los que se cuentan la aterosclerosis, hipertensión, enfermedades de los vasos capilares, enfermedades del riñón y ceguera.

Nuestra exposición empieza con la **glucólisis**, una ruta utilizada por todas las células del cuerpo para extraer parte de la energía química inherente a la molécula de glucosa. Esta vía convierte también la glucosa en piruvato; de este modo queda preparada la situación para la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y H_2O. La síntesis *de novo* de la glucosa, esto es la **gluconeogénesis**, es una función del hígado y de los riñones, y puede ser tratada de modo conveniente después de la glucólisis, ya que utiliza algunos de los mismos enzimas utilizados en la ruta glucolítica, aunque las reacciones catalizadas son en la dirección opuesta. A diferencia de la glucólisis, que produce ATP, la gluconeogénesis requiere ATP; es, por consiguiente, un proceso que requiere energía. La consecuencia es que sólo algunos de los pasos catalizados por enzimas pueden ser comunes a las rutas glucolítica y gluconeogénica. En efecto, algunos enzimas adicionales, incluidos algunos presentes en las mitocondrias, están implicados en la gluconeogénesis, haciendo que el proceso global sea exergónico. A lo largo del capítulo se resaltará la regulación de los pasos limitantes de velocidad y de los pasos catalizados por enzimas clave, especialmente en el caso de la síntesis de glucógeno

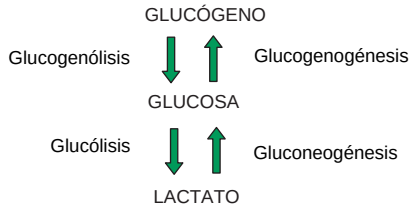


FIGURA 14.1
Relación de la glucosa con las principales rutas del metabolismo glucídico.

(**glucogenogénesis**) y la degradación del mismo (**glucogenólisis**). Muchas células almacenan glucógeno con el fin de tener al alcance glucosa para su uso posterior. El hígado es menos egoísta: almacena glucógeno no para su propio uso, sino para el mantenimiento de los niveles de glucosa sanguínea, asegurando así que otros tejidos del cuerpo, especialmente el cerebro, reciban un suministro adecuado de este importante sustrato. La regulación de la síntesis y degradación del glucógeno sirve como modelo de nuestro conocimiento actual sobre la manera en que actúan las hormonas y el modo en que se pueden regular otras vías metabólicas. Este tema significa una gran contribución a nuestro conocimiento de la condición diabética, de la inanición y de la manera como los tejidos corporales responden al estrés, al trauma grave y a la lesión. La nomenclatura y química de los glúcidos se presenta en el Apéndice (p. 1172).

14.2 GLUCÓLISIS

La glucólisis tiene lugar en todas las células humanas

La **vía glucolítica** o de **Embden–Meyerhof** es un proceso antiguo, que se da en todas las células del cuerpo humano, y en la que tiene lugar la degradación anaeróbica de la glucosa a lactato. Esta vía es un ejemplo de **fermentación anaeróbica**, término utilizado para referirse a rutas mediante las cuales los organismos extraen energía química a partir de combustibles de alto contenido energético en ausencia de oxígeno molecular. La glucólisis representa, para muchos tejidos, una vía de emergencia productora de energía, capaz de rendir 2 moles de ATP a partir de un mol de glucosa, en ausencia de oxígeno molecular (Figura 14.2). Esto significa que cuando se corta el suministro de oxígeno a un tejido, aún se pueden mantener los niveles de ATP mediante la glucólisis, al menos durante un corto período de tiempo. Se podrían dar muchos ejemplos, aunque la capacidad de recurrir a la glucólisis como fuente de energía es especialmente importante para el ser humano en el nacimiento. Con la excepción del cerebro, la circulación sanguínea disminuye en la mayoría de las partes del cuerpo del neonato durante el parto. Normalmente, el cerebro no queda privado de oxígeno durante el parto, pero otros tejidos dependen de la glucólisis para obtener ATP hasta que la circulación vuelve a su estado normal y el oxígeno vuelve a ser asequible. Así, se conserva el oxígeno para su uso por el **cerebro**, lo que ilustra uno de los muchos mecanismos que han evolucionado para asegurar la supervivencia del tejido cerebral en momentos de dificultad. El oxígeno no es necesario para la glucólisis, e incluso la presencia de este elemento puede suprimirla indirectamente. Este fenómeno se denomina **efecto Pasteur**, y se considera en una sección posterior. Sin embargo, la glucólisis puede tener lugar, cosa que en efecto ocurre, en células con un suministro abundante de oxígeno molecular. Siempre y cuando las células también contengan mitocondrias, el producto final de la glucólisis en presencia de oxígeno es el piruvato en lugar del lactato. El piruvato puede ser oxidado completamente a CO_2 y H_2O por enzimas situados dentro de la mitocondria. La glucólisis, por tanto, proporciona las condiciones para la oxidación aeróibica de los glúcidos. El proceso global de la glucólisis, más la oxidación mitocondrial posterior del piruvato a CO_2 y H_2O, se expresa en la siguiente ecuación:

$$\text{D-glucosa} + 6\ O_2 + 32\ ADP^{3-} + 32\ P_i^{2-} + 32\ H^+ \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 32\ ATP^{4-} (C_6H_{12}O_6)$$

Debe observarse que se produce mucho más ATP en la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y H_2O que en la conversión de glucosa a lactato. Esto tiene consecuencias importantes que se considerarán en detalle más adelante. Para que la glucosa se oxide completamente a CO_2 y H_2O, debe ser previamente convertida en piruvato mediante la glucólisis (Figura 14.3). La importancia de la glucólisis como vía preparatoria queda

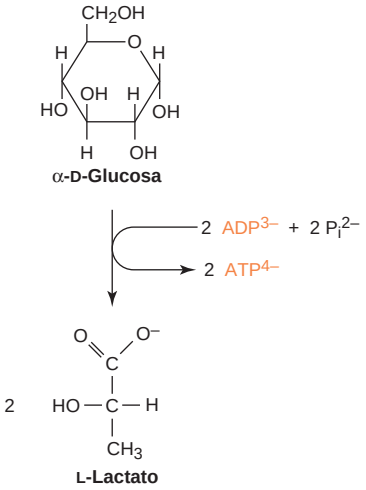


FIGURA 14.2
Ecuación global ajustada para la suma de las reacciones de la ruta glucolítica.

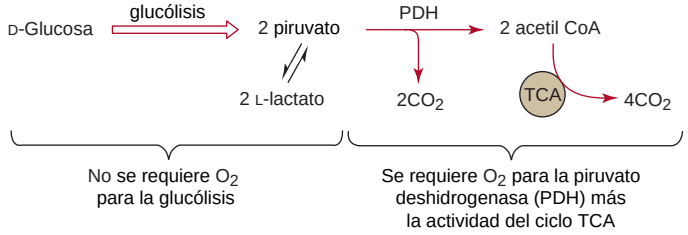


FIGURA 14.3
La glucólisis es una ruta preparatoria del metabolismo aeróbico de la glucosa.
TCA significa ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

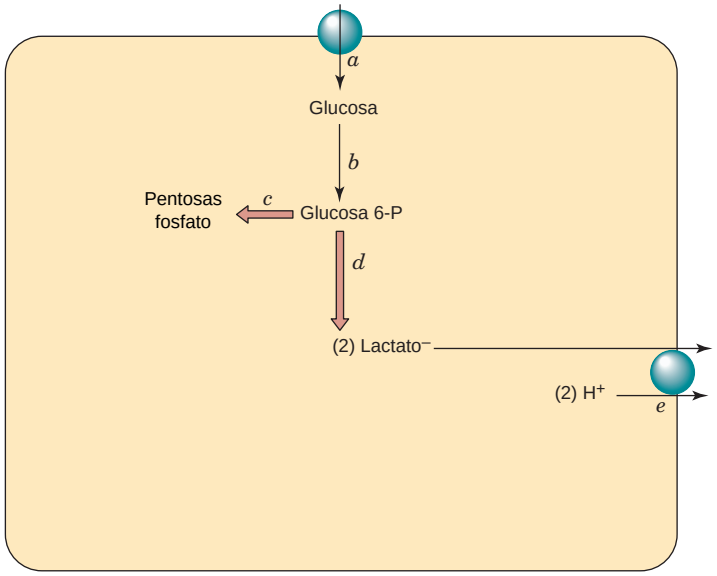
muy bien ilustrada con el ejemplo del cerebro. Este tejido tiene una necesidad absoluta de glucosa y procesa la mayor parte de la misma a través de la vía glucolítica. A continuación, el piruvato producido se oxida completamente a CO_2 y H_2O en las mitocondrias. El cerebro humano adulto utiliza aproximadamente 120 g de glucosa diarios con el fin de satisfacer sus necesidades de ATP. Por el contrario, la glucólisis con lactato como producto final, es el principal mecanismo de producción de ATP en otros tejidos. Los eritrocitos no tienen mitocondrias y son, por tanto, incapaces de convertir el piruvato en CO_2 y H_2O. La córnea, el cristalino y ciertas regiones de la retina reciben un suministro de sangre limitado y carecen también de mitocondrias (porque las mitocondrias absorberían y dispersarían la luz), dependiendo así de la glucólisis como mecanismo principal de producción de ATP. La médula renal, los testículos, los leucocitos y las fibras musculares blancas dependen casi totalmente de la glucólisis como fuente de ATP, debido también a que estos tejidos tienen relativamente pocas mitocondrias. Los tejidos que dependen mayoritariamente de la glucólisis para la producción de ATP consumen alrededor de 40 g de glucosa por día en un adulto normal.

El **almidón** es la forma de almacenamiento de la glucosa en las plantas y contiene **enlaces glucosídicos *α*-1,4** junto con **ramas glucosídicas *α*-1,6.** El **glucógeno** es la forma de almacenamiento de la glucosa en los tejidos animales, y contiene la misma clase de enlaces glucosídicos y de ramificaciones. Se denomina glucógeno exógeno aquel que comemos y digerimos; el glucógeno endógeno es el que se sintetiza o almacena en nuestros tejidos. El almidón o glucógeno exógenos son hidrolizados en el tracto intestinal produciendo glucosa, mientras que el glucógeno endógeno almacenado en nuestros tejidos es convertido en glucosa o en glucosa 6-fosfato por los enzimas presentes dentro de las células. Los disacáridos que son fuente importante de glucosa en nuestra dieta incluyen el azúcar de la leche (lactosa) y el azúcar común (sacarosa). La hidrólisis de estos azúcares por los enzimas de las células en cepillo del tracto intestinal se trata en la p. 1102. La glucosa puede ser utilizada como fuente de energía para las células del tracto intestinal. No obstante, estas células no dependen demasiado de la glucosa, puesto que la mayor parte de sus requerimientos energéticos es satisfecha por el catabolismo de la glutamina (véase p. 784). La mayor parte de la glucosa pasa a través de las células del tracto intestinal hasta la sangre de la vena porta y de ahí a la circulación general, para ser utilizada por otros tejidos. El primer tejido importante que tiene la oportunidad de eliminar glucosa de la sangre de la vena porta es el hígado. Cuando la glucosa sanguínea es elevada, el hígado elimina glucosa para los procesos consumidores de glucosa de la glucogenogénesis y la glucólisis. Cuando la glucosa sanguínea es baja, el hígado proporciona glucosa a la sangre mediante los procesos de producción de glucosa, la glucogenólisis y la gluconeogénesis. El hígado es también el primer órgano expuesto a la sangre que fluye del páncreas, y por lo tanto está expuesto a las concentraciones más elevadas de las hormonas liberadas por este tejido endocrino: el **glucagón** y la **insulina**. Estos dos importantes reguladores hormonales de los niveles de glucosa sanguínea tienen efectos sobre pasos catalizados por enzimas clave en el hígado.

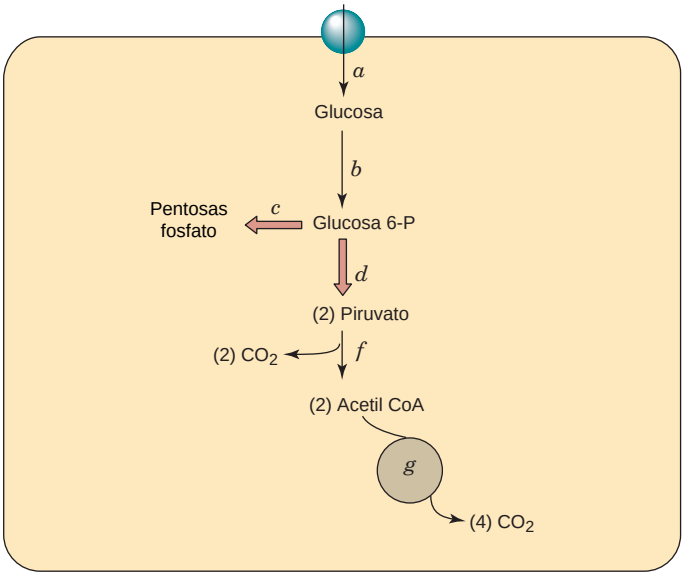
La glucosa se metaboliza de forma diferente en diversas células

Después de penetrar la membrana plasmática mediante transporte facilitado por **GLUT-1 (transportador de *glucosa*, isoforma 1**) la glucosa se metaboliza principalmente por la glucólisis en los **hematíes** (Figura 14.4*a*). Dado que los hematíes no tienen mitocondrias, el producto final de la glucólisis es el ácido láctico, el cual es liberado a la sangre. La glucosa utilizada por la **vía de las pentosas fosfato** en

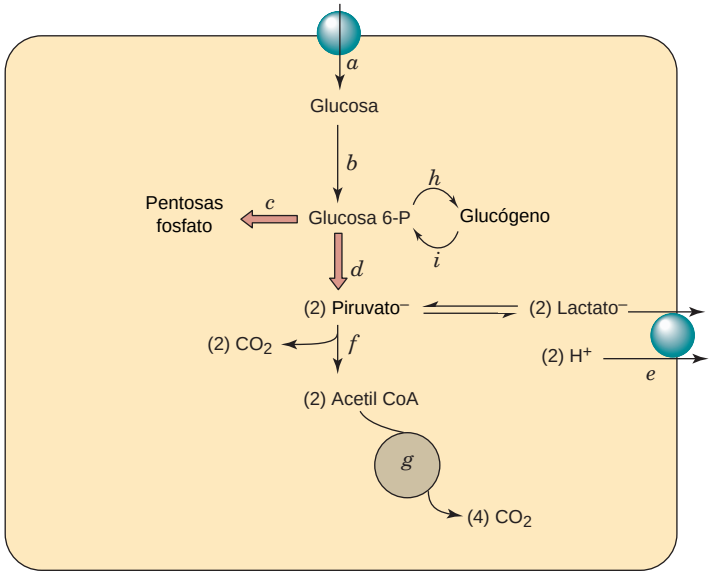
FIGURA 14.4
Visión general de las principales rutas a través de las cuales se metaboliza la glucosa en las células de determinados tejidos del organismo.
(*a*) Transporte de la glucosa al interior de la célula mediante la proteína transportadora de glucosa (GLUT); (*b*) fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa; (*c*) ruta de las pentosas fosfato; (*d*) glucólisis; (*e*) transporte de ácido láctico al exterior de la célula; (*f*) descarboxilación del piruvato por la piruvato deshidrogenasa; (*g*) ciclo TCA; (*h*) glucogenogénesis; (*i*) glucogenólisis; (*j*) lipogénesis; (*k*) gluconeogénesis; (*l*) hidrólisis de la glucosa 6-fosfato y liberación de glucosa desde la célula a la sangre; (*m*) formación de glucurónidos (destoxificación de fármacos y de bilirrubina por conjugación) por la vía del ácido glucurónico.



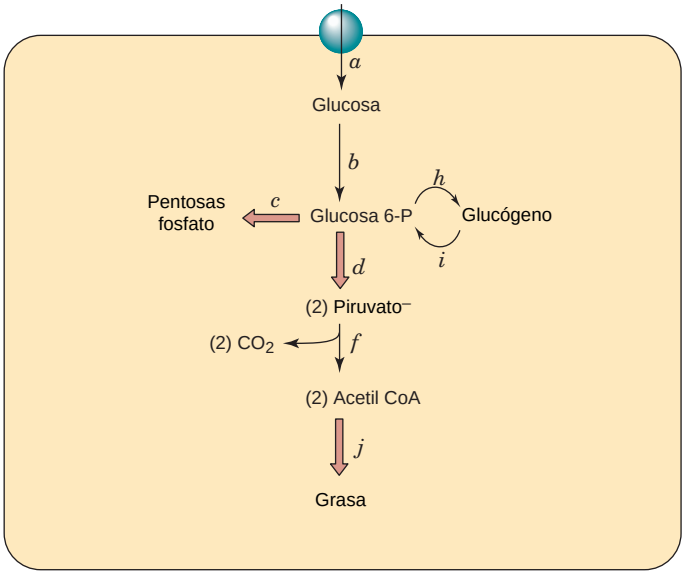
Eritrocitos



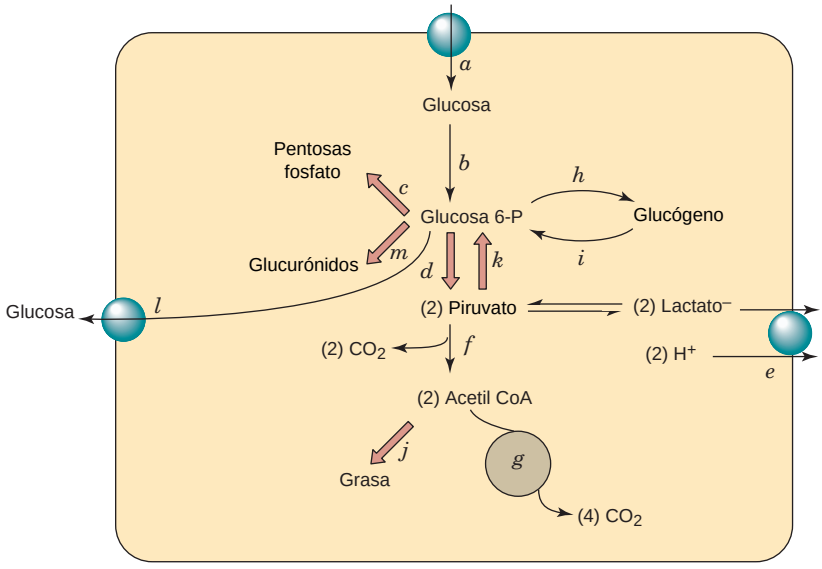
Células del tejido cerebral



Células del tejido muscular y del tejido cardíaco



Células del tejido adiposo



Células del parénquima hepático

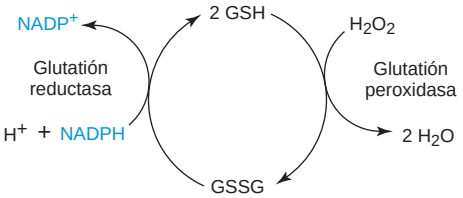


FIGURA 14.5
La destrucción del peróxido de hidrógeno depende de la reducción del glutatión oxidado por el NADPH generado en la ruta de las pentosas fosfato.

los eritrocitos proporciona NADPH para mantener el glutatión en estado reducido, el cual tiene un importante papel en la destrucción de los peróxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno (Figura 14.5). Los peróxidos provocan daños irreversibles a las membranas, el DNA y otros muchos componentes celulares y, en consecuencia, deben ser destruidos para evitar la muerte celular (véase p. 22).

El **cerebro** capta la glucosa por transporte facilitado, en una forma que es independiente de la insulina, mediante la **GLUT-3** (**transportador de glucosa isoforma 3**) (Figura 14.4*b*). La glucólisis en el cerebro da lugar a piruvato, el cual es oxidado a CO_2 y H_2O gracias a la combinación del complejo de la piruvato deshidrogenasa y el ciclo TCA. La vía de las pentosas fosfato es activa en estas células, y genera parte del NADPH necesario para la síntesis reductora y para el mantenimiento del glutatión en estado reducido.

Las **células musculares** y **cardíacas** utilizan rápidamente la glucosa (Figura 14.4*c*). La insulina estimula el transporte de glucosa al interior de ambos tipos de células mediante **GLUT-4** (**transportador de glucosa isoforma 4**). En ausencia de insulina, GLUT-4 se encuentra en vesículas membranosas localizadas en el citosol de las células con lo que no puede facilitar el transporte de glucosa (Figura 14.6). La unión de la insulina a su receptor en la membrana plasmática inicia una cascada de señalización que promueve la translocación y fusión de las vesículas que contienen GLUT-4 con la membrana plasmática con lo que se coloca GLUT-4 en una posición en la que puede facilitar el transporte de glucosa. Una vez captada por las células musculares y cardíacas, la glucosa puede ser utilizada por la glucólisis para dar piruvato, el cual es utilizado por el complejo de la piruvato deshidrogenasa y el ciclo TCA para proporcionar ATP. A diferencia de los tejidos considerados anteriormente, el músculo y el corazón pueden sintetizar cantidades considerables de glucógeno que es un combustible importante que las células de estos tejidos almacenan para su consumo ulterior.

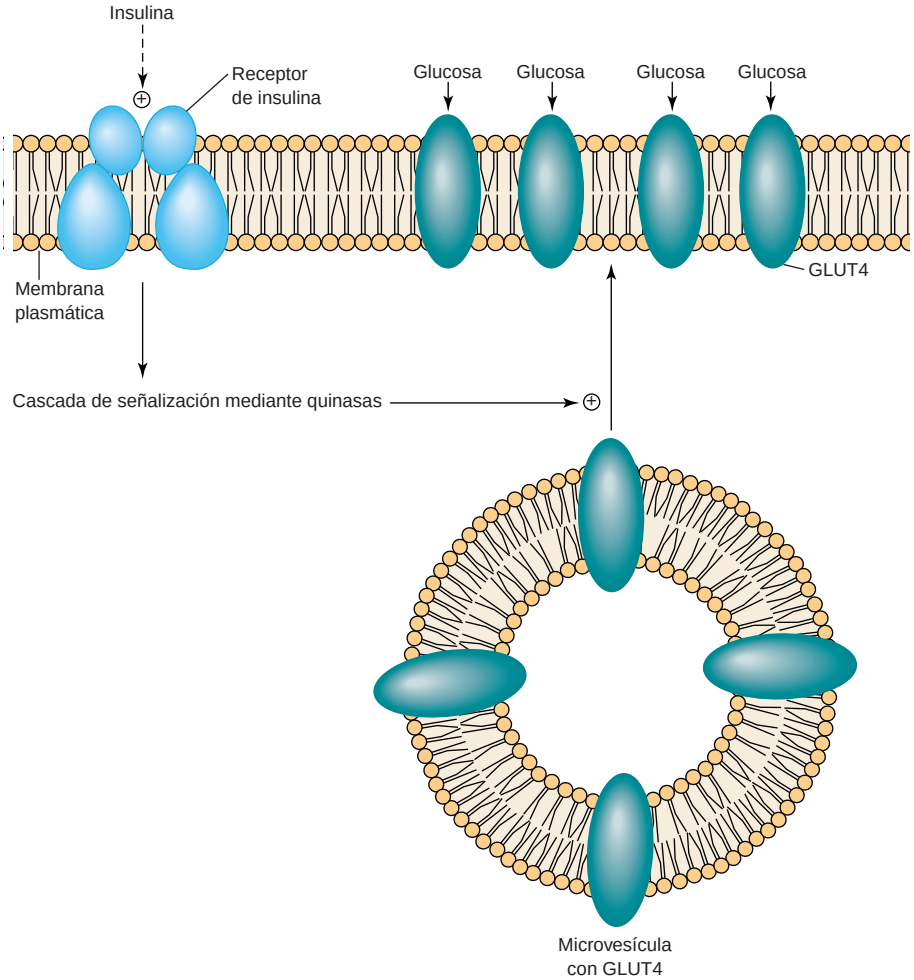


FIGURA 14.6
La insulina estimula la captación de glucosa por el tejido adiposo y por el músculo incrementando el número de transportadores de glucosa (GLUT-4) de la membrana plasmática.

En el **tejido adiposo**, al igual que en el músculo, la captación de glucosa depende, y es activada, por la insulina (Figura 14.4*d*). La insulina funciona mediante el mismo mecanismo, esto es, inicia una cascada de señalización que culmina en la fusión de las vesículas que contienen GLUT-4 con la membrana plasmática de los adipocitos en donde GLUT-4 funciona importando glucosa al interior de la célula (Figura 14.6). Como en otras células, el piruvato se genera por la glucólisis, y es oxidado por el complejo de la piruvato deshidrogenasa para dar acetil CoA, el cual se utiliza primordialmente para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. La vía de las pentosas fosfato es importante en el tejido adiposo, ya que el NADPH es necesario para los pasos reductores de la síntesis de ácidos grasos. El tejido adiposo también tiene la capacidad de glucogenogénesis y glucogenólisis, pero estos procesos están más limitados en este tejido que en el músculo, el hígado y el corazón.

El **hígado** posee el mayor número de formas de utilizar la glucosa (Figura 14.4*e*). La captación de la glucosa tiene lugar de forma independiente de la insulina por medio de un transportador de glucosa de baja afinidad y alta capacidad, **GLUT-2**. La glucosa es utilizada en buena proporción por la vía de las pentosas fosfato para la producción de NADPH, el cual es necesario para la síntesis reductora, el mantenimiento del glutatión en estado reducido y numerosas reacciones catalizadas por los sistemas enzimáticos del retículo endoplasmático. Una función cuantitativamente menos importante, pero no menos vital, de la vía de las pentosas fosfato (véase p. 666) es la provisión de ribosa fosfato, requerida para la síntesis de nucleótidos tales como ATP y los que se encuentran en el DNA y en el RNA. La glucosa también se utiliza para la síntesis de glucógeno, lo que hace que el almacenamiento de glucógeno sea una característica importante del hígado. La glucosa también se puede utilizar en la **ruta del ácido glucurónico**, importante en la **destoxificación** de **fármacos** y de **bilirrubina** (véanse Capítulos 11, p. 477 y 24, p. 1073). El hígado posee además capacidad para la glucólisis, y el piruvato producido se utiliza como fuente de acetil CoA para la oxidación completa por el ciclo TCA y para la síntesis de grasa por el proceso de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. A diferencia de otros tejidos, el hígado es único en el sentido de que tiene la capacidad de convertir precursores tricarbonados, tales como lactato, piruvato, glicerol y alanina, en glucosa por el proceso de la gluconeogénesis, para satisfacer la necesidad de glucosa de otras células.

14.3 RUTA GLUCOLÍTICA

La glucosa es combustible y arde en un tubo de ensayo, produciendo calor y luz, aunque no, por supuesto, ATP. Las células utilizan unos 30 pasos para transformar la glucosa en CO_2 y H_2O, un proceso aparentemente ineficiente, ya que puede tener lugar en un solo paso en el tubo de ensayo. Sin embargo, reacciones laterales y algunas de las propias etapas utilizadas por la célula para "quemar" la glucosa a CO_2 y H_2O conservan una cantidad significativa de energía en forma de ATP. Dicho de otro modo, el ATP se produce mediante la "combustión" controlada de la glucosa en la célula, y la glucólisis sólo representa los primeros pasos, mostrados en la Figura 14.7, del proceso global.

La glucólisis tiene lugar en tres fases

Se puede describir convenientemente la glucólisis considerando que se desarrolla en tres fases principales (véase Figura 14.7).
Fase de preparación:

$$\text{D-glucosa} + 2\ ATP^{4-} \rightarrow \text{D-fructosa 1,6-bifosfato}^{4-} + 2\ ADP^{3-} + 2\ H^{+}$$

Fase de partición:

$$\text{D-fructosa 1,6-bifosfato}^{4-} \rightarrow 2\ \text{D-gliceraldehído 3-fosfato}^{2-}$$

Fase de oxidorreducción–fosforilación:

$$2\ \text{D-gliceraldehído 3-fosfato}^{2-} + 4\ ADP^{3-} + 2\ P_i^{2-} + 2\ H^{+} \rightarrow 2\ \text{L-lactato}^{-} + 4\ ATP^{4-} + 2\ H_2O$$

Suma:

$$\text{D-glucosa} + 2\ ADP^{3-} + 2\ P_i^{2-} \rightarrow 2\ \text{L-lactato}^{-} + 2\ ATP^{4-} + 2\ H_2O$$

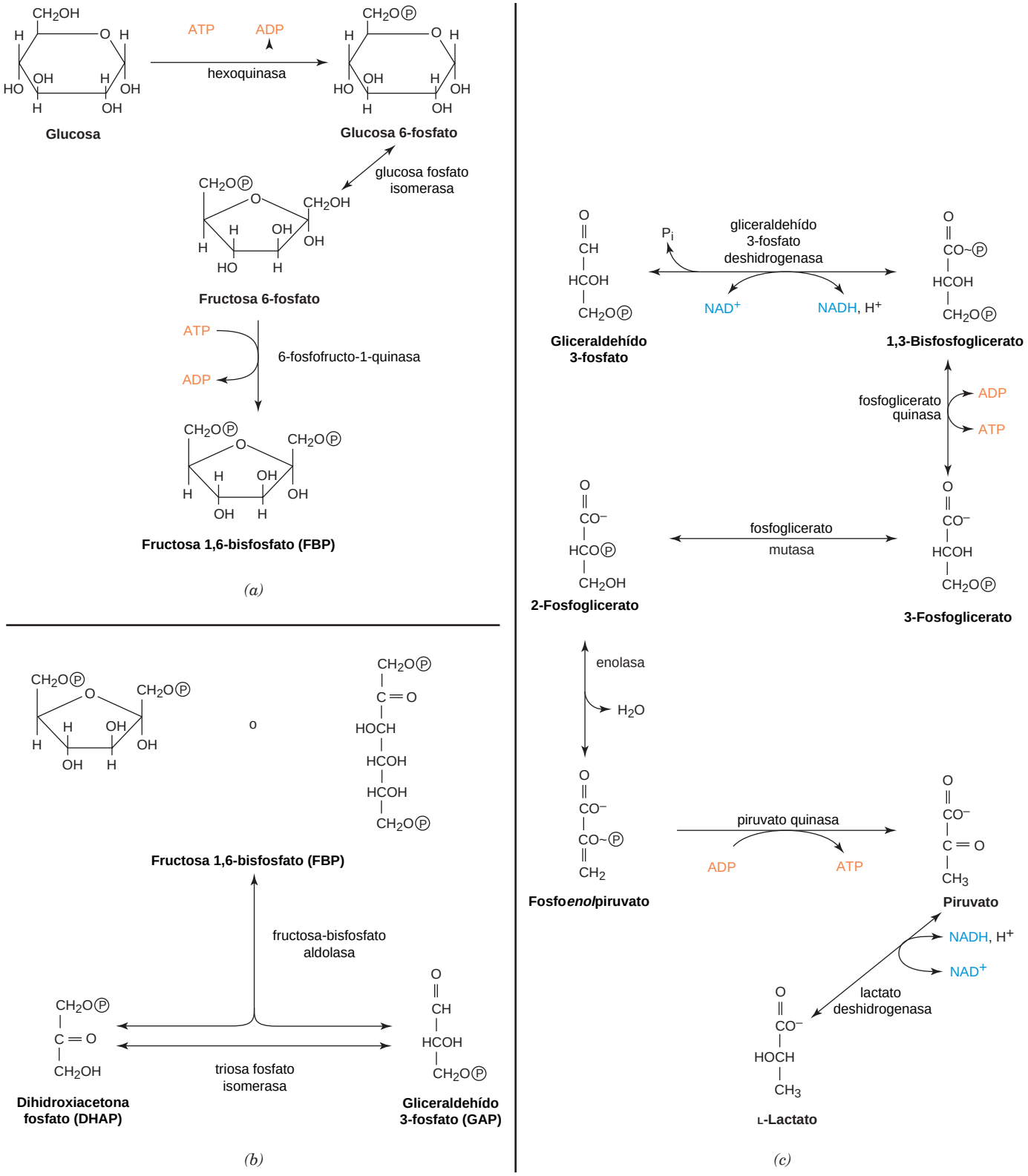


FIGURA 14.7
La ruta glucolítica dividida en sus tres fases.
El símbolo P se refiere al grupo fosforilo PO_3^{2-}; ~indica un enlace fosfato de alta energía. (*a*) Fase de preparación. (*b*) Fase de partición. (*c*) Fase de oxidorreducción–fosforilación.

La **fase de preparación** supone el aporte de dos moléculas de ATP para convertir la glucosa en una molécula de fructosa 1,6-bifosfato. En la fase de preparación de la glucólisis se "invierte" ATP. Sin embargo, se gana más ATP del invertido en la posterior realización del proceso glucolítico. La **fase de partición** "rompe" la molécula hexacarbonada de la fructosa 1,6-bifosfato en dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato. En la **fase de oxidorreducción–fosforilación** se convierten dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato en dos moléculas de lactato, con la consiguiente producción de cuatro moléculas de ATP. El proceso global de la glucólisis genera dos moléculas de lactato y dos moléculas de ATP a costa de una molécula de glucosa.

La primera fase prepara la molécula de glucosa

La **hexoquinasa** cataliza el primer paso de la vía glucolítica (véanse Figura 14.7*a* y paso 1). Aunque la reacción consume ATP, proporciona a la glucólisis una buena puesta en marcha al atrapar la glucosa en forma de glucosa 6-fosfato (G6P) dentro del citosol de la célula, donde están situados todos los enzimas glucolíticos. Los ésteres fosfóricos son compuestos hidrofílicos cargados que no penetran fácilmente las membranas celulares. La fosforilación de la glucosa con ATP es una reacción termodinámicamente favorable que requiere el uso de un enlace fosfato de alta energía. Es una reacción irreversible en las condiciones celulares. Sin embargo, la reacción inversa no es una forma de sintetizar ATP o de hidrolizar glucosa 6-fosfato para dar glucosa. La hidrólisis de la G6P se consigue con una reacción diferente, catalizada por el enzima **glucosa 6-fosfatasa**:

$$\text{glucosa 6-fosfato}^{2-} + H_2O \rightarrow \text{glucosa} + P_i^{2-}$$

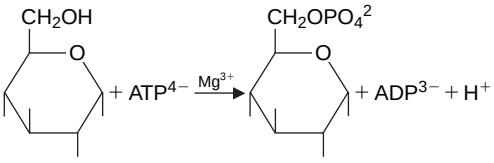
Esta reacción es termodinámicamente favorable en la dirección presentada, y no puede ser utilizada en las células para la síntesis de G6P a partir de glucosa. (Un error frecuente es hacer notar que el ATP y el ADP están involucrados en la reacción catalizada por la hexoquinasa, pero pasar por alto que no están involucrados en la reacción catalizada por la glucosa 6-fosfatasa.) La glucosa 6-fosfatasa es un enzima importante del hígado que funciona produciendo glucosa libre a partir de la G6P en el último paso, tanto de la gluconeogénesis como de la glucogenólisis; no tiene ningún papel en la glucólisis.

La siguiente reacción es un paso de la vía glucolítica fácilmente reversible, catalizada por el enzima **fosfoglucoisomerasa** (paso 2). Este paso no está sujeto a regulación y, dado que es totalmente reversible, funciona tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis.

La **6-fosfofructo-1-quinasa**, también llamada **fosfofructoquinasa-1**, cataliza la siguiente reacción, una fosforilación dependiente de ATP de la fructosa 6-fosfato (F6P) que da fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) (paso 3). Este enzima, el favorito de muchos estudiosos de la bioquímica, está sujeto a una variedad de efectores y es considerado frecuentemente como el enzima regulador más importante de la vía glucolítica. La reacción es irreversible en condiciones intracelulares, es decir, que representa una vía para producir FBP, pero no una vía para producir ATP o F6P por la reacción inversa. Esta reacción utiliza el segundo ATP necesario para "preparar" la glucosa, completando de este modo la primera fase de la glucólisis.

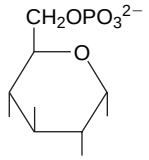
La segunda fase consiste en la partición de un intermedio fosforilado

La **fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa** cataliza la rotura de la fructosa 1,6-bifosfato en una molécula de dihidroxiacetona fosfato y otra de gliceraldehído 3-fosfato (GAP) (véase Figura 14.7*b*) (paso 4). Es ésta una reacción reversible, y el enzima se denomina aldolasa porque la reacción global es una variante de una rotura aldólica en una dirección y una condensación aldólica en la otra. La **triosa fosfato isomerasa** cataliza seguidamente la interconversión reversible de dihidroxiacetona fosfato y GAP para completar la fase de partición de la glucólisis (paso 5). Con la transformación de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en GAP, se consigue la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de GAP.

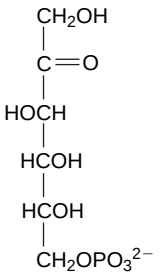


α-D-Glucosa α-D-Glucosa 6-fosfato

Paso 1

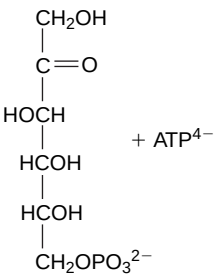


α-D-Glucosa 6-fosfato

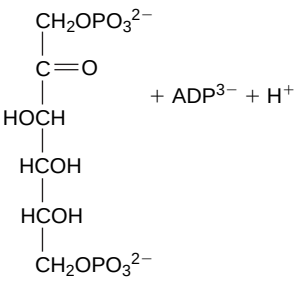


α-D-Fructosa 6-fosfato

Paso 2

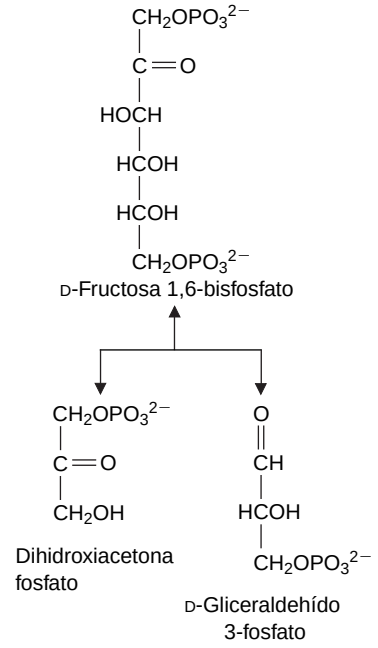


D-Fructosa 6-fosfato

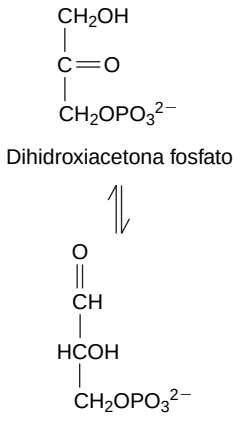


D-Fructosa 1,6-bisfosfato

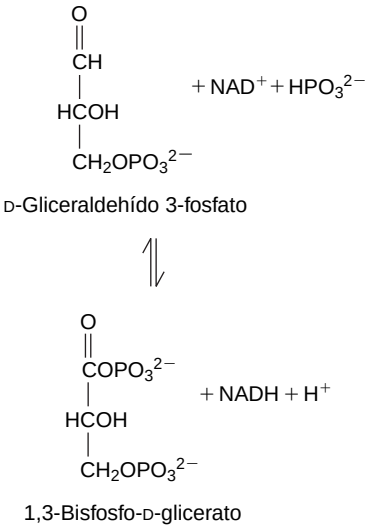
Paso 3



Paso 4



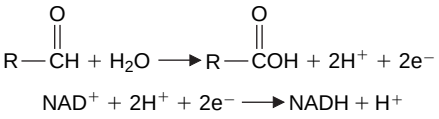
Paso 5



Paso 6

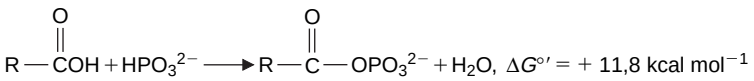
En la tercera fase tienen lugar reacciones de oxidorreducción y la síntesis de ATP

La primera reacción de la última fase de la glucólisis (Figura 14.7*c*) está catalizada por la **gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa** (paso 6). Esta reacción es de interés considerable por los resultados que se obtienen en un solo paso catalizado por un enzima. Un aldehído (gliceraldehído 3-fosfato) es oxidado a un ácido carboxílico, con la reducción de NAD^+ a NADH. Además de NADH, la reacción produce 1,3-bisfosfoglicerato, un anhídrido mixto de un ácido carboxílico y de un ácido fosfórico. El 1,3-bisfosfoglicerato tiene una elevada energía libre negativa de hidrólisis, lo que le permite participar en una reacción posterior que produce ATP. La reacción global catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa puede visualizarse como el acoplamiento de una reacción exergónica muy favorable con una reacción endergónica desfavorable. Se puede considerar que la reacción exergónica está compuesta por una semirreacción en la que se oxida un aldehído a ácido carboxílico, acoplada seguidamente a otra semirreacción en la que el NAD^+ se reduce a NADH:

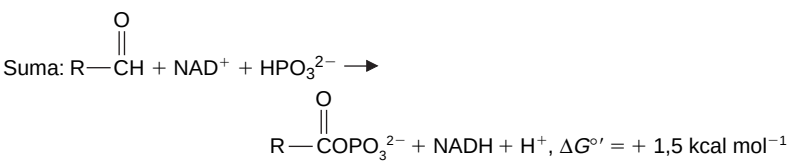


La reacción global (suma de las semirreacciones) es muy exergónica, y en ella el aldehído se oxida a ácido carboxílico y el NAD^+ se reduce a NADH:

Un segundo componente endergónico de la reacción corresponde a la formación de un anhídrido mixto entre el ácido carboxílico y el ácido fosfórico:



La reacción global supone el acoplamiento de los componentes endergónico y exergónico, y produce un cambio de energía libre estándar global de $+1{,}5$ kcal mol^{-1}.



La reacción es fácilmente reversible en las células, y es utilizada tanto en la vía glucolítica como en la gluconeogénica. En la Figura 14.8 se muestra el mecanismo propuesto para la reacción catalizada enzimáticamente. El gliceraldehído 3-fosfato reacciona con un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína del enzima, generando un **tiohemiacetal**. A continuación tiene lugar una reacción de oxidación–reducción interna en la que el NAD^+ ligado se reduce a NADH y el tiohemiacetal se oxida produciendo un éster tiólico de alto contenido energético. A continuación NAD^+ exógeno reemplaza el NADH ligado y el éster tiólico de alta energía reacciona con P_i formando el anhídrido mixto y regenerando el grupo sulfhidrilo libre. El anhídrido mixto se disocia del enzima. Nótese que no hay un grupo ácido carboxílico libre (—COOH) generado durante la reacción. En lugar de ello, el enzima genera un grupo carboxilo en forma de éster tiólico de alta energía, que es convertido por reacción con P_i en otro compuesto de alta energía, un anhídrido mixto entre los ácidos fosfórico y carboxílico.

La reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa requiere NAD^+ y produce NADH. Dado que el citosol de las células sólo tiene una cantidad limitada de NAD^+, es de todo punto necesario para una actividad glucolítica continuada que el NADH vuelva a reoxidarse a NAD^+. Si no fuera así, la glucólisis se detendría por falta de NAD^+. Más adelante (véase p. 609) se consideran las opciones que tienen las células para conseguir la regeneración del NAD^+ a partir de NADH.

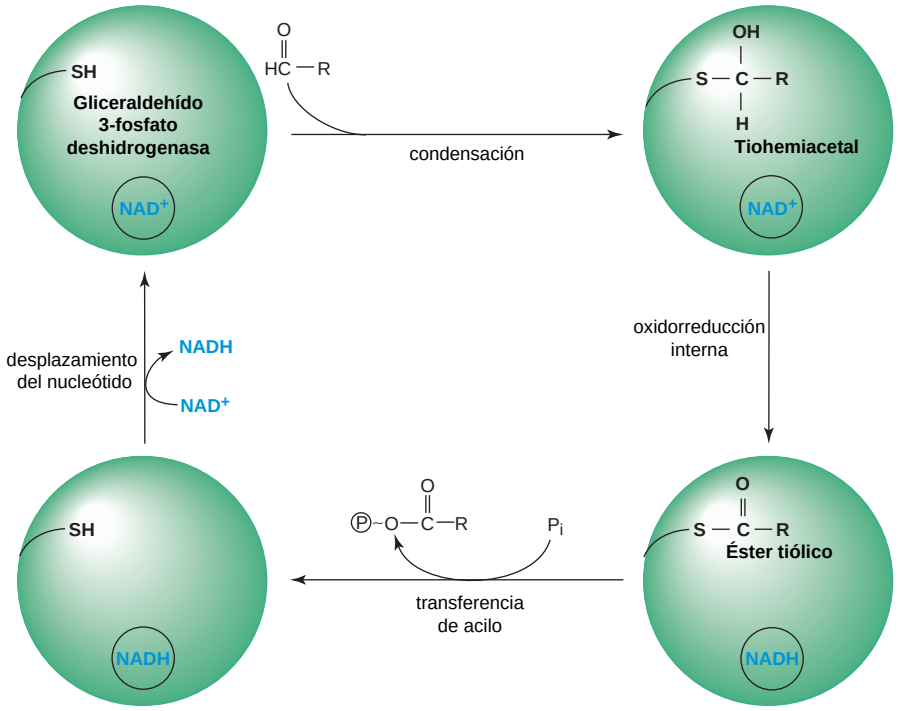
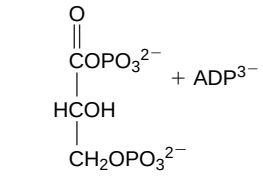


FIGURA 14.8
Mecanismo de acción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
Los círculos grandes representan el enzima; el círculo pequeño, el centro de fijación del NAD^+; RCOH, gliceraldehído 3-fosfato; —SH grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína localizado en el centro activo y ~P, el enlace fosfato de alta energía del 1,3-bisfosfoglicerato.

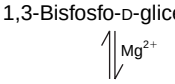
La siguiente reacción, catalizada por la **fosfoglicerato quinasa**, produce ATP a partir del compuesto de alta energía 1,3-bisfosfoglicerato (Figura 14.7*c*, paso 7). Este es el primer centro de producción de ATP en la vía glucolítica. Dado que en la fase de preparación se "invirtieron" 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, y dado que por cada glucosa se producen dos moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato, todo el ATP "invertido" en la fase de preparación se recupera en este paso de la glucólisis. Como la producción de ATP tiene lugar en el sentido directo de la reacción y la utilización de ATP lo tiene en la dirección inversa, puede parecer sorprendente que la reacción sea fácilmente reversible y *pueda* utilizarse tanto en la vía glucolítica como en la gluconeogénica. La reacción proporciona un medio para la generación de ATP en la ruta glucolítica, pero, cuando se la necesita para la síntesis de glucosa, puede también ser utilizada en la reacción inversa para la síntesis de 1,3-bisfosfoglicerato, y serlo a expensas de ATP. El sistema de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa–fosfoglicerato quinasa constituye un ejemplo de fosforilación a nivel de sustrato, término que hace referencia a un proceso en el que un sustrato participa en una reacción catalizada por un enzima que produce ATP o GTP. La **fosforilación a nivel de sustrato** se contrapone a la fosforilación oxidativa mitocondrial (véase p. 577). Obsérvese, no obstante, que la combinación de las reacciones catalizadas por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la fosfoglicerato quinasa consigue el acoplamiento de una oxidación (un aldehído se oxida a ácido carboxílico) con una fosforilación.

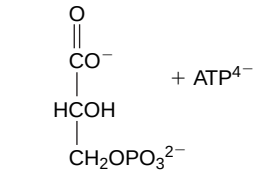
La **fosfoglicerato mutasa** convierte el 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato (paso 8). Es ésta una reacción fácilmente reversible, y en la que el **2,3-bisfosfoglicerato** (ó **2,3-difosfoglicerato**) funciona como un intermedio obligatorio en el centro activo del enzima (E):

$$\text{E-fosfato} + \text{3-fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{E} + \text{2,3-bisfosfoglicerato}$$
$$\text{E} + \text{2,3-bisfosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{E-fosfato} + \text{2-fosfoglicerato}$$
$$\text{Suma:} \quad \text{3-fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{2-fosfoglicerato}$$



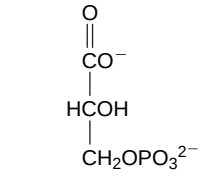
1,3-Bisfosfo-D-glicerato



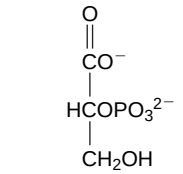


3-fosfo-D-glicerato

Paso 7



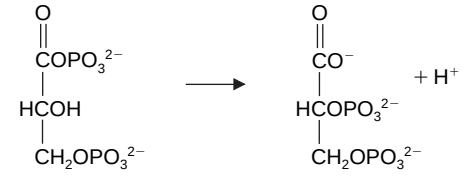
3-fosfo-D-glicerato



2-fosfo-D-glicerato

Paso 8

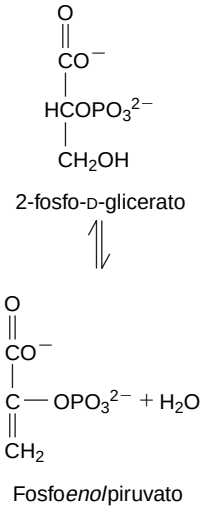
La participación del 2,3-bisfosfoglicerato como intermedio hace que sea imprescindible la presencia de una cantidad catalítica de este compuesto en las células. Esto puede apreciarse si se observa que el E-P en esta reacción no puede generarse sin 2,3-bisfosfoglicerato. Las células sintetizan 2,3-bisfosfoglicerato, independientemente de la reacción catalizada por la fosfoglicerato mutasa, mediante una reacción catalizada por la 2,3-bisfosfoglicerato mutasa:



1,3-Bisfosfo-D-glicerato 2,3-Bisfosfo-D-glicerato

Este último enzima presenta la particularidad de ser **catalíticamente bifuncional**, funcionando primero como mutasa para la formación de 2,3-bisfosfoglicerato y después como fosfatasa, al hidrolizar el 2,3-bisfosfoglicerato en 3-fosfoglicerato y P_i. Todas las células contienen cantidades muy pequeñas de 2,3-bisfosfoglicerato, con el propósito de producir la forma fosforilada de la fosfoglicerato mutasa recién sintetizada. Las cantidades necesarias son pequeñas, puesto que la fosforilación tiene lugar una sola vez, ya que el enzima fosforilado se regenera con el sustrato en cada ciclo de reacción. A diferencia de todas las demás células los hematíes contienen 2,3-bisfosfoglicerato en concentraciones muy altas porque éste sirve como un importante efector alostérico negativo para la regulación de la asociación del oxígeno con la hemoglobina (véase p. 406). Del 15 al 25% de la glucosa que se convierte en lactato en los glóbulos rojos lo hace a través de la denominada "**ruta del BPG**" (Figura 14.9). Cuando una molécula de glucosa se convierte en dos moléculas de lactato por esta ruta no se genera ATP neto, al obviarse en ella la reacción catalizada por la fosfoglicerato quinasa.

La **enolasa** cataliza la eliminación de agua del 2-fosfoglicerato para formar el fosfo*enol*piruvato (PEP) en la reacción siguiente (paso 9; Figura 14.7*c*). Esta es una reacción notable desde el punto de vista de la generación de un compuesto con un fosfato de alta energía a partir de uno con un nivel de energía marcadamente menor. La variación de energía libre estándar ($\Delta G^{\circ\prime}$) para la hidrólisis del fosfo*enol*piruvato es $-14{,}8$ kcal mol^{-1}, valor claramente superior al de la energía libre estándar del 2-fosfoglicerato ($-4{,}2$ kcal mol^{-1}). Aunque la reacción catalizada por la enolasa es fácilmente reversible, a consecuencia de su acción sobre el 2-fosfoglicerato tiene lugar un gran cambio en la distribución de energía. Aunque los niveles de energía libre del PEP y del 2-fosfoglicerato no son demasiado diferentes, los niveles de energía libre de sus productos de hidrólisis (piruvato y glicerato, respectivamente) son muy distintos. Puesto que $\Delta G^{\circ\prime} = G^{\circ\prime}_{\text{productos}} - G^{\circ\prime}_{\text{sustratos}}$, esto explica las grandes diferencias en la energía libre estándar de hidrólisis de estos dos compuestos.



Paso 9

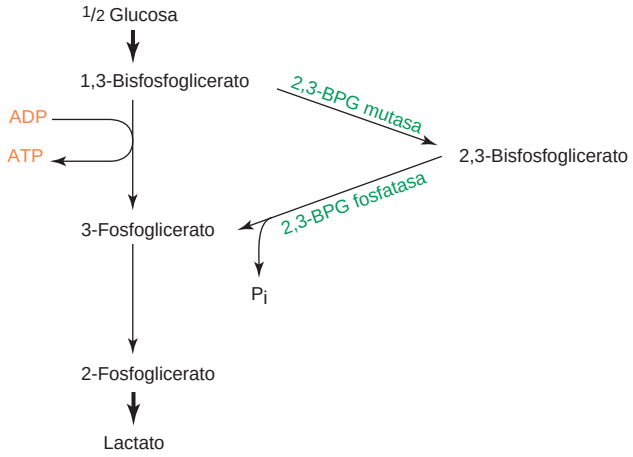
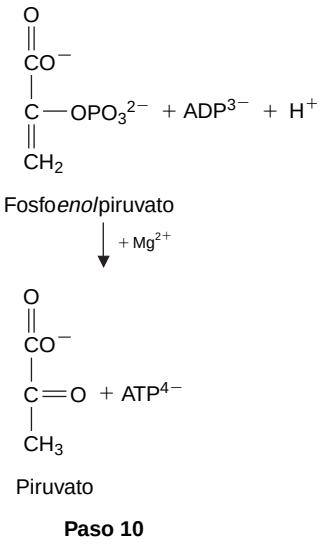


FIGURA 14.9
La ruta del 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) consta de reacciones catalizadas por el enzima bifuncional 2,3-BPG mutasa/fosfatasa.

La **piruvato quinasa** (paso 10; Figura 14.7*c*) lleva a cabo una nueva **fosforilación a nivel de sustrato**: esto es, la síntesis de ATP con la conversión del compuesto de alta energía PEP en piruvato. La reacción no es reversible en las condiciones que existen en la célula. Constituye una vía para la síntesis de ATP, pero no es reversible en las condiciones que existen en la célula, y no puede ser utilizada para la síntesis de PEP cuando éste es necesario para la síntesis de glucosa.

El último paso de la vía glucolítica es una reacción de oxidorreducción catalizada por la **lactato deshidrogenasa** (paso 11; Figura 14.7*c*). El piruvato se reduce dando L-lactato y el NADH se oxida a NAD^+. Esta reacción es totalmente reversible y es la única reacción que puede dar lugar a la formación del L-lactato por el cuerpo o que puede utilizar L-lactato.



Rendimiento en ATP y ecuación igualada de la glucólisis anaeróbica

La conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de lactato por la glucólisis da lugar a la formación neta de dos moléculas de ATP. Se utilizan dos moléculas de ATP en la fase de preparación para que se pueda escindir la glucosa. Sin embargo, en pasos posteriores se obtienen cuatro moléculas de ATP por lo que la producción neta global de ATP por la vía glucolítica son dos moléculas de ATP:

$$\text{D-glucosa} + 2\ ADP^{3-} + 2\ P_i^{2-} \rightarrow 2\ \text{L-lactato}^- + 2\ ATP^{4-} + 2\ H_2O$$

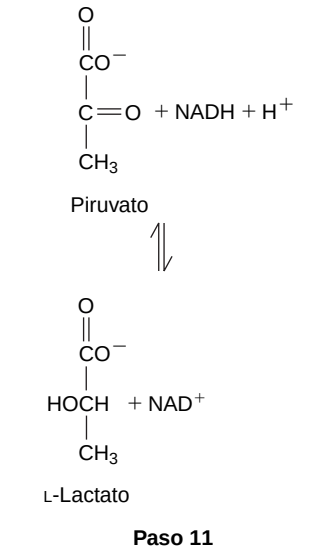
Las células biológicas sólo tienen una cantidad limitada de ADP y P_i. El flujo a través de la vía glucolítica depende, por tanto, de un suministro adecuado de estos sustratos. Si no se utiliza el ATP para la realización de trabajo la glucólisis se detiene por falta de ADP y/o P_i. Por tanto, el ATP generado ha de utilizarse en procesos normales relacionados con trabajo para que pueda darse la glucólisis. La ecuación de la utilización de ATP para cualquier proceso relacionado con trabajo es sencillamente

$$ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + P_i^{2-} + H^+ + \text{“trabajo”}$$

Cuando se dobla esta ecuación y se añade a la dada anteriormente para la glucólisis, excluyendo el trabajo realizado ya que se supone que es necesario para el recambio de ATP, la ecuación igualada se transforma en

$$\text{D-glucosa} \rightarrow 2\ \text{lactato}^- + 2\ H^+$$

La ecuación ilustra un punto sumamente importante: la glucólisis anaeróbica genera ácido, un problema creado por el metabolismo para las células ya que el pH intracelular se ha de mantener cerca de la neutralidad para la actividad óptima de los enzimas.



El NADH generado durante la glucólisis se ha de reoxidar a NAD^+: papel de la lactato deshidrogenasa

El NADH y el NAD^+ no aparecen en la ecuación igualada suma de los diferentes pasos de la glucólisis anaeróbica. Existe un acoplamiento perfecto entre la generación de NADH y su utilización en la glucólisis (Figura 14.7*c*). A nivel de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se generan dos moléculas de NADH, y, a su vez, se utilizan dos moléculas de NADH a nivel de la lactato deshidrogenasa en la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de lactato. El NAD^+, molécula soluble presente en el citosol, sólo es asequible en cantidades limitadas y por tanto debe regenerarse a partir de NADH para que la vía glucolítica continúe sin debilitarse. Las dos reacciones implicadas son

$$\text{D-gliceraldehído 3-fosfato} + NAD^+ + P_i \rightarrow \text{1,3-bisfosfo-D-glicerato} + NADH + H^+$$

$$\text{piruvato} + NADH + H^+ \rightarrow \text{L-lactato} + NAD^+$$

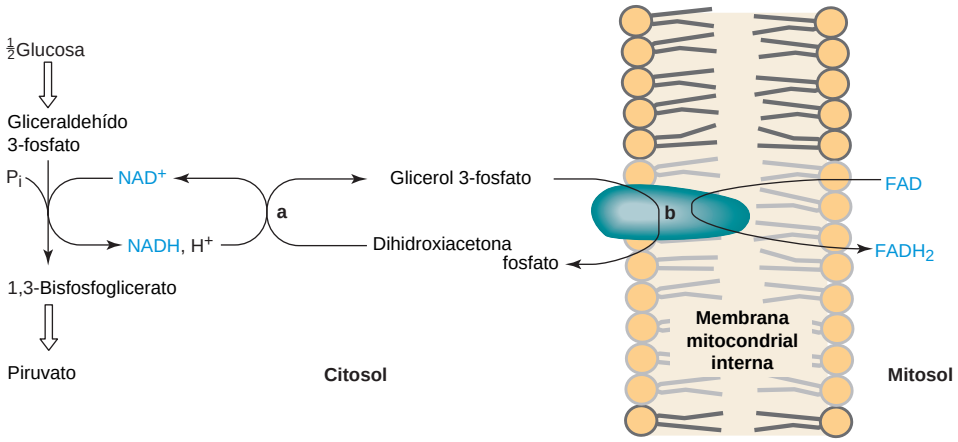
El acoplamiento de estas dos reacciones da la reacción suma:

$$\text{D-gliceraldehído 3-fosfato} + \text{piruvato} + P_i \rightarrow \text{1,3-bisfosfoglicerato} + \text{L-lactato}$$

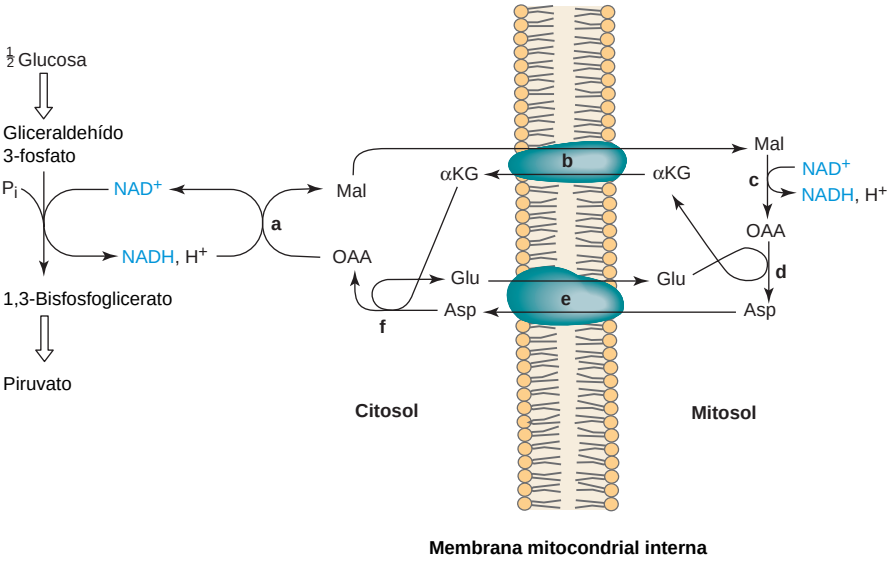
Este perfecto acoplamiento de los equivalentes de reducción mediante estas dos reacciones es necesario en condiciones de anaerobiosis o en células que carecen de mitocondrias para que pueda darse la glucólisis. En presencia de oxígeno y mitocondrias, los equivalentes de reducción en forma de NADH generados a nivel de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa pueden ser captados por los sistemas de lanzadera de la mitocondria para la síntesis de ATP. Cuando esto tiene lugar, el producto final de la glucólisis es el piruvato en lugar del lactato. Se conocen dos sistemas de lanzadera para el transporte de equivalentes de reducción desde el espacio citosólico a la matriz mitocondrial (mitosol). La membrana mitocondrial interna no es permeable al NADH (véase p. 584).

El NADH que se genera durante la glucólisis puede reoxidarse a través de sistemas de lanzadera de sustrato

En la Figura 14.10*a* se muestra la **lanzadera del glicerol fosfato**; la **lanzadera del malato–aspartato** se muestra en la Figura 14.10*b* (véase también p. 584). Los tejidos con células que contienen mitocondrias tienen la capacidad de lanzar equiva-



(a)



(b)

FIGURA 14.10
Lanzaderas del transporte de equivalentes de reducción desde el citosol a la cadena de transporte electrónico mitocondrial.
(*a*) Lanzadera del glicerol fosfato: **a**, la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica oxida el NADH; **b**, la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa de la cara exterior de la membrana interna mitocondrial reduce el FAD. (*b*) Lanzadera del malato–aspartato: **a**, la malato deshidrogenasa citosólica reduce el oxalacetato (OAA) a malato; **b**, el "antiport" de ácidos dicarboxílicos de la membrana interna mitocondrial cataliza el intercambio eléctricamente neutro de malato por α-cetoglurato (α-KG); **c**, la malato deshidrogenasa mitocondrial produce NADH intramitocondrial; **d**, la aspartato aminotransferasa mitocondrial transamina glutamato y oxalacetato; **e**, el "antiport" de glutamato–aspartato de la membrana mitocondrial interna cataliza el intercambio electrogénico de glutamato por aspartato; **f**, la aspartato aminotransferasa citosólica transamina el aspartato y el α-cetoglutarato.

lentes de reducción desde el citosol al mitosol. La proporción relativa de las actividades de las dos lanzaderas varía de tejido a tejido; por ejemplo, el hígado es el que hace un mayor uso de la lanzadera del malato–aspartato, mientras que algunas células musculares pueden ser más dependientes de la lanzadera del glicerol fosfato. Los sistemas de lanzadera son irreversibles, esto es, representan mecanismos para trasladar equivalentes de reducción al mitosol, pero no son mecanismos capacitados para trasladar equivalentes de reducción mitocondriales al citosol.

La membrana mitocondrial interna posee un gran número de sistemas de transporte (véase p. 583), pero no tiene ninguno que sea efectivo para el oxalacetato. Por esta razón, el oxalacetato se transamina con el glutamato, produciendo aspartato, el cual sale de la mitocondria a cambio del glutamato. Este es el paso irreversible de la lanzadera. El aspartato que entra en el citosol se transamina con el α-cetoglutarato, dando oxalacetato y glutamato. El oxalacetato acepta los equivalentes de reducción del NADH y se transforma en malato. Seguidamente, el malato penetra por la membrana mitocondrial interna, en donde es oxidado por la **malato deshidrogenasa** mitocondrial. Esto produce NADH dentro del mitosol y regenera oxalacetato, con lo que el ciclo queda completo. La ecuación global, igualada, de la suma de todas las reacciones de la lanzadera del malato–aspartato, es, simplemente:

$$NADH_{citosol} + H^+_{citosol} + NAD^+_{mitosol} \rightarrow NAD^+_{citosol} + NADH_{mitosol} + H^+_{mitosol}$$

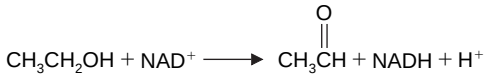
La lanzadera del glicerol fosfato es más sencilla, en el sentido de que hay en ella menos reacciones implicadas, si bien debe observarse que en la membrana mitocondrial interna se genera $FADH_2$ en lugar del NADH que se produce en el compartimiento mitosólico. El paso irreversible de la lanzadera está catalizado por la **glicerol 3-fosfato deshidrogenasa** mitocondrial. El centro activo de este enzima se encuentra sobre la superficie citosólica de la membrana mitocondrial interna, lo que hace que sea innecesario que el glicerol 3-fosfato penetre en el mitosol para ser oxidado. La ecuación global igualada de la suma de reacciones de la lanzadera del glicerol fosfato es

$$NADH_{citosol} + H^+_{citosol} + FAD_{membrana\ interna} \rightarrow NAD^+_{citosol} + FADH_{2\ membrana\ interna}$$

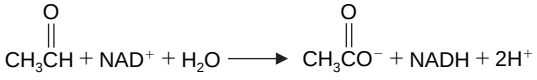
Las lanzaderas son importantes en otras rutas oxidorreductoras

Oxidación del alcohol

El primer paso del metabolismo del alcohol (esto es, **etanol**) es su oxidación a **acetaldehído** con producción de NADH por la **alcohol deshidrogenasa**.



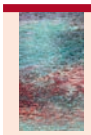
Este enzima está localizado casi exclusivamente en el citosol de las células del parénquima hepático. El acetaldehído generado atraviesa la membrana interna mitocondrial para ser oxidado por una **aldehído deshidrogenasa** mitosólica.



El NADH generado en el último paso puede ser utilizado directamente por la cadena de transferencia electrónica mitocondrial. No obstante, el NADH generado por la alcohol deshidrogenasa citosólica debe ser previamente reoxidado a NAD^+ mediante una de las lanzaderas. Así, la capacidad de los seres humanos para oxidar el alcohol depende de la capacidad del hígado para transportar los equivalentes de reducción desde el citosol al mitosol por esos sistemas de lanzadera.

Formación de glucurónido

Las lanzaderas juegan un papel importante en la formación de **glucurónidos** hidrosolubles de la **bilirrubina** y de diversos **fármacos** (vease p. 477) de forma que



APLICACIÓN CLÍNICA 14.1
Alcohol y barbitúricos

La intoxicación alcohólica aguda de una persona hace que ésta presente una mayor sensibilidad a los efectos depresores generales de los barbitúricos. Los barbitúricos y el alcohol interactúan ambos con el canal de cloruro activado por γ-aminobutirato (GABA). Esta activación inhibe la estimulación neuronal, lo que puede explicar los efectos depresivos que producen ambos compuestos. Esta combinación de fármacos es muy peligrosa, ya que las dosis normales prescritas para los barbitúricos tienen consecuencias potencialmente letales en presencia de etanol. Además de los efectos depresores, tanto del etanol como de los barbitúricos, sobre el sistema nervioso central (SNC), el etanol inhibe el metabolismo de los barbitúricos prolongando el tiempo que éstos permanecen en el cuerpo de modo efectivo. El etanol inhibe la hidroxilación de los barbitúricos por el retículo endoplasmático del hígado. Esta reacción catalizada por el sistema del citocromo dependiente de NADPH, produce derivados hidrosolubles de los barbitúricos que son eliminados rápidamente de la circulación por los riñones. Los niveles sanguíneos de los barbitúricos permanecen altos cuando está presente el etanol, lo que produce una mayor depresión del SNC.

De modo sorprendente, el alcohólico es menos sensible a los barbitúricos cuando está sobrio. El consumo crónico del etanol produce, aparentemente, cambios adaptativos en la sensibilidad del SNC a los barbitúricos (tolerancia cruzada). También da lugar a la inducción de los enzimas del retículo endoplasmático hepático implicados en las reacciones de hidroxilación. En consecuencia, el alcohólico sobrio es capaz de metabolizar los barbitúricos más rápidamente. Esto da lugar al siguiente cuadro. Un alcohólico sobrio tiene problemas para dormirse, aún después de ingerir varias píldoras para dormir, debido a que su hígado tiene una capacidad aumentada para hidroxilar el barbitúrico contenido en las píldoras. En su frustración consume más píldoras seguido de alcohol. Se produce la somnolencia, la cual puede, sin embargo, venir seguida por depresión respiratoria y muerte ya que el alcohólico, aunque menos sensible a los barbitúricos cuando está sobrio, continúa siendo sensible al efecto sinérgico del alcohol.

Misra, P. S., Lefevre, A., Ishii, H., Rubin, E. y Lieber, C. S. Increase of ethanol, meprobamate and pentobarbital metabolism after chronic ethanol administration in man and in rats. *Am. J. Med.* 51:346, 1971.

el cuerpo pueda eliminar estos compuestos a través de la orina y la bilis. En este proceso, la UDP-glucosa (véase la estructura en la p. 673) se oxida a ácido **UDP-glucurónico** (véase la estructura en p. 674).

$$\text{UDP-D-glucosa} + 2\ NAD^+ + H_2O \rightarrow \text{Ácido UDP-D-glucurónico} + 2\ NADH + 2\ H^+$$

A continuación, y en una reacción que tiene lugar primordialmente en el hígado, la molécula de ácido glucurónico "activado" es transferida a una molécula aceptora apolar, tal como la **bilirrubina** o algún compuesto extraño al cuerpo:

$$\text{Ácido UDP-D-glucurónico} + R\text{—}OH \rightarrow \text{Ácido } R\text{—}O\text{—glucurónico} + UDP$$

Para que este proceso pueda continuar, el exceso de NADH generado en la primera reacción debe ser reoxidado por medio de las lanzaderas. Dado que la oxidación del etanol y la conjugación de fármacos son propiedades del hígado, cuando las dos tienen lugar simultáneamente pueden superar la capacidad combinada de las lanzaderas. Una buena cosa que hay que indicar a los pacientes es que no se debe mezclar la administración de compuestos farmacológicamente activos con el consumo de alcohol (véase Apli. Clín. 14.1).

Las dos rutas de lanzadera proporcionan diferentes cantidades de ATP

El NADH mitosólico formado como consecuencia de la actividad de la lanzadera del malato–aspartato puede ser utilizado por la cadena respiratoria mitocondrial para la producción de 2,5 moléculas de ATP mediante la fosforilación oxidativa:

$$NADH_{mitosol} + H^+ + \tfrac{1}{2}\ O_2 + 2\tfrac{1}{2}\ ADP + 2\tfrac{1}{2}\ P_i \rightarrow NAD^+_{mitosol} + 2\tfrac{1}{2}\ ATP + H_2O$$

Por el contrario, el $FADH_2$, obtenido por la actividad de la lanzadera del glicerol fosfato, sólo produce 1,5 moléculas de ATP:

$$FADH_{2\ \text{membrana interna}} + \tfrac{1}{2}\ O_2 + 1\tfrac{1}{2}\ ADP + 1\tfrac{1}{2}\ P_i \rightarrow FAD_{\text{membrana interna}} + 1\tfrac{1}{2}\ ATP + H_2O$$

Así, con la disponibilidad de oxígeno y mitocondrias, el rendimiento en ATP derivado de la oxidación del NADH generado por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en la conversión de una molécula de glucosa a dos moléculas de piruvato es de 3 ó 5 según el sistema de lanzadera utilizado.

La glucólisis es inhibida por reactivos de grupo sulfhidrilo y por el fluoruro

Entre los inhibidores de la ruta glucolítica mejor conocidos se encuentran los **reactivos de grupos sulfhidrilo** y el **fluoruro**. Los reactivos de grupos sulfhidrilo inhiben la **gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa** porque este enzima tiene en el centro activo un residuo de cisteína catalíticamente importante. Durante un ciclo catalítico el grupo sulfhidrilo de esta cisteína reacciona con el gliceraldehído 3-fosfato para dar un tiohemiacetal (Figura 14.8). Los reactivos de grupo sulfhidrilo son, usualmente, **compuestos que contienen mercurio** o que son **alquilantes** tales como el **yodoacetato**, los cuales reaccionan covalentemente con el grupo sulfhidrilo de la cisteína (Figura 14.11).

El **fluoruro** es un potente inhibidor de la enolasa. El Mg^{2+} y el P_i forman un complejo iónico con el ion fluoruro, el cual es responsable de la inhibición de la enolasa al interferir en la unión de su sustrato (Mg^{2+} 2-fosfoglicerato^{2-}).

El arseniato impide la síntesis de ATP pero no inhibe la glucólisis

El arsénico pentavalente o **arseniato** es especial respecto a sus efectos sobre la glucólisis. No es un inhibidor del proceso y, en ciertas condiciones, estimula el flujo a través de la glucólisis. El arseniato impide la síntesis neta de ATP al causar arsenólisis en la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. El arseniato se parece mucho al P_i, y puede sustituir a éste en reacciones catalizadas por enzimas. El resultado en el caso de la reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa es la formación de un anhídrido mixto del ácido arsénico y del grupo carboxilo del 3-fosfoglicerato (Figura 14.12). El 1-arseniato-3-fosfoglicerato es inestable y experimenta hidrólisis espontánea a 3-fosfoglicerato y arseniato inorgánico. De este modo, aunque la glucólisis continúa sin debilitarse en presencia de arseniato, no se forma 1,3-bisfosfoglicerato, lo que da lugar a la pérdida de capacidad para sintetizar ATP en el paso catalizado por la fosfoglicerato quinasa. La consecuencia de ello es que cuando la glucólisis se lleva a cabo en presencia de arseniato, no hay síntesis neta de ATP, ya que el ATP invertido en la fase de preparación queda equilibrado por el ATP generado en el paso de la piruvato quinasa. Esto, juntamente con el hecho de que la arsenólisis también interfiere en

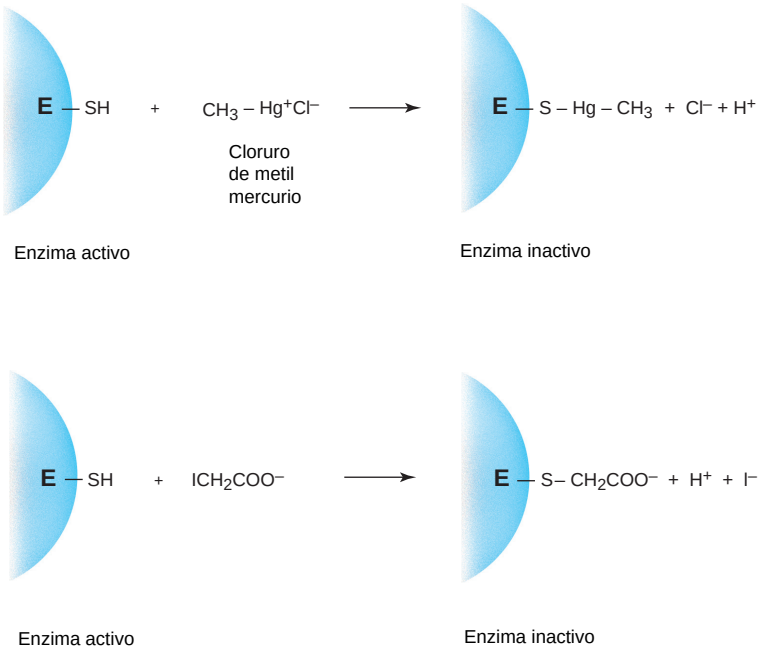


FIGURA 14.11
Mecanismo responsable de la inactivación de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa con reactivos de sulfhidrilo.

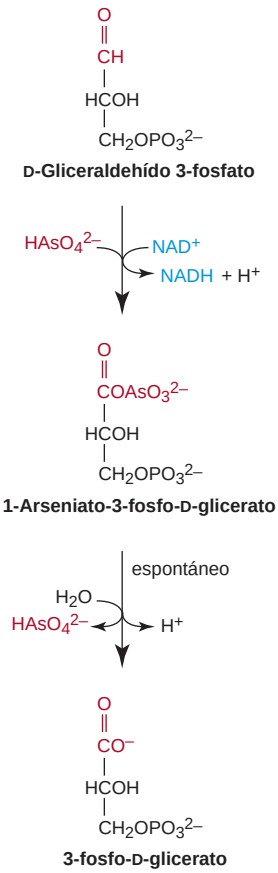
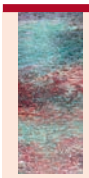


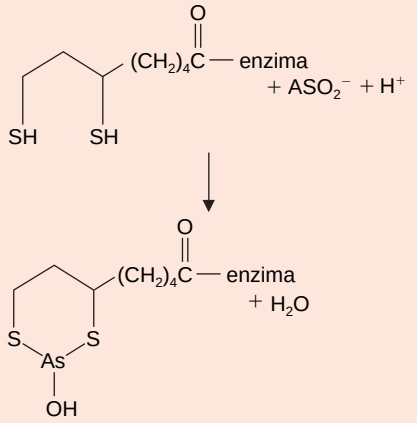
FIGURA 14.12
El arseniato desacopla la oxidación de la fosforilación en el paso catalizado por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.



APLICACIÓN CLÍNICA 14.2

Envenenamiento por arsénico

La mayoría de las formas del arsénico son tóxicas, pero la forma trivalente (arsenito o AsO_2^-) es mucho más tóxica que la forma pentavalente (arseniato o $HAsO_4^{2-}$). Cuando el arseniato sustituye al P_i, en las reacciones biológicas se produce menos ATP. El arseniato compite con los centros de fijación de P_i de los enzimas, lo que da lugar a la formación de ésteres de arseniato que son inestables. El arsenito funciona mediante un mecanismo completamente diferente que implica la formación de un complejo estable con el ácido lipoico ligado al enzima:



En su mayor parte, el envenenamiento por arsénico se explica por la inhibición de aquellos enzimas que requieren ácido lipoico como coenzima. Entre ellos se cuentan la piruvato deshidrogenasa, la α-cetoglutarato deshidrogenasa y la α-cetoácido (de cadena ramificada) deshidrogenasa. El envenenamiento crónico por arsénico a través de agua de pozo contaminada con pesticidas arsenicales o a través de los esfuerzos de un asesino, tiene su mejor diagnóstico en la determinación de la concentración de arsénico en el cabello o en las uñas de la víctima. En un individuo normal se encontrarían unos 0,5 mg de arsénico por kilogramo de cabello. El cabello de una persona expuesta de manera crónica al arsénico puede tener hasta 100 veces esta cantidad.

Hindmarsh, J. T. y McCurdy, R. F. Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 23:315, 1986; y Mudur, G. Half of Bangladesh population at risk of arsenic poisoning. *Br. Med. J.* 320:822, 2000.

la formación de ATP por fosforilación oxidativa, hace que el arseniato sea un compuesto tóxico (véase Apli. Clín. 14.2).

14.4 REGULACIÓN DE LA RUTA GLUCOLÍTICA

Al igual que otras rutas complejas de múltiples pasos, la regulación del flujo a través de la vía glucolítica está determinada por la actividad de varios enzimas y no por un solo enzima "limitante de velocidad". Además, la contribución relativa de un enzima dado al flujo glucolítico varía de tejido a tejido y con los cambios en el estado nutricional y hormonal. La mejor información cuantitativa con respecto a la contribución relativa de un enzima determinado al flujo glucolítico en un conjunto de condiciones se obtiene determinando la "**fuerza controladora**" del enzima. No es una tarea sencilla realizar esta determinación ya que depende de poder determinar el efecto que sobre el flujo a través de una vía tiene una pequeña inhibición de un enzima específico. Con el fin de ilustrar este concepto supongamos que la inhibición de la actividad de un enzima concreto en un 10% no tiene ninguna influencia sobre el flujo a través de la vía. En estas condiciones la fuerza controladora del enzima es cero (0 dividido por 10), lo que quiere decir que la actividad de este enzima no determina el flujo en las condiciones seleccionadas. Supongamos ahora que la inhibición de un enzima en un 10% dé lugar a una inhibición del 10% del flujo a través de la vía. En este caso la fuerza controladora del enzima sería 1,0 (10 dividido por 10) lo que significa que el flujo es totalmente dependiente de la actividad del enzima en estas condiciones; es decir, la actividad del enzima es totalmente limitante de la velocidad de esta vía. Supongamos ahora que la inhibición de un enzima en un 10% da lugar a sólo un 5% de inhibición del flujo a través de la ruta. La fuerza controladora del enzima es 0,5 (5 dividido por 10) lo que significaría que la mitad del control del flujo a través de esta vía viene determinado por este enzima. El resto del control probablemente se reparte sobre uno o más pasos ya que las fuerzas controladoras de los pasos de una ruta lineal deben sumar 1,0 por definición.

Con el bien entendido que la regulación del flujo a través de la glucólisis depende del tejido considerado y del estado nutricional y hormonal del tejido, los enzimas de los que se cree generalmente que juegan los papeles reguladores más importantes en la ruta glucolítica, es decir con la mayor fuerza controladora son la **hexoquinasa**, la **6-fosfofructo-1-quinasa** y la **piruvato quinasa**. En la Figura 14.13 se muestra un resumen de las características reguladoras importantes de estos enzimas. Estos enzimas se consideran reguladores basándose en la evolución de su sensibilidad a la regulación por efectores alostéricos y/o modificación covalente. Un enzima no sujeto a regulación cataliza, muy probablemente, una "**reacción próxima al equilibrio**", mientras que un enzima regulador cataliza, muy probablemente, una "**reacción distante del equilibrio**" en las condiciones intracelulares. Esto es lógico, ya que el flujo a través del enzima regulado está restringido debido a los controles impuestos sobre tal enzima. Un enzima no regulador es tan activo que fácilmente lleva las concentraciones de sus sustratos y productos a los valores de equilibrio. Se puede determinar si una reacción catalizada por un enzima está próxima o distante del equilibrio comparando la constante de equilibrio establecida para la reacción con el cociente de concentraciones expresado en la ley de acción de masas, tal como se da dentro de una célula. La constante de equilibrio para la reacción A + B → C + D se define como

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

en donde los corchetes indican las concentraciones en el equilibrio. El **cociente según la ley de acción de masas** se calcula de modo similar, salvo que en la ecuación se utilizan las concentraciones de los reactivos y productos en estado estacionario (ss) en la célula:

$$\text{cociente según la ley de acción de masas} = \frac{[C]_{ss}[D]_{ss}}{[A]_{ss}[B]_{ss}}$$

Si el cociente según la ley de acción de masas es aproximadamente igual a la K_{eq}, se dice que el enzima es suficientemente activo para catalizar una reacción próxima

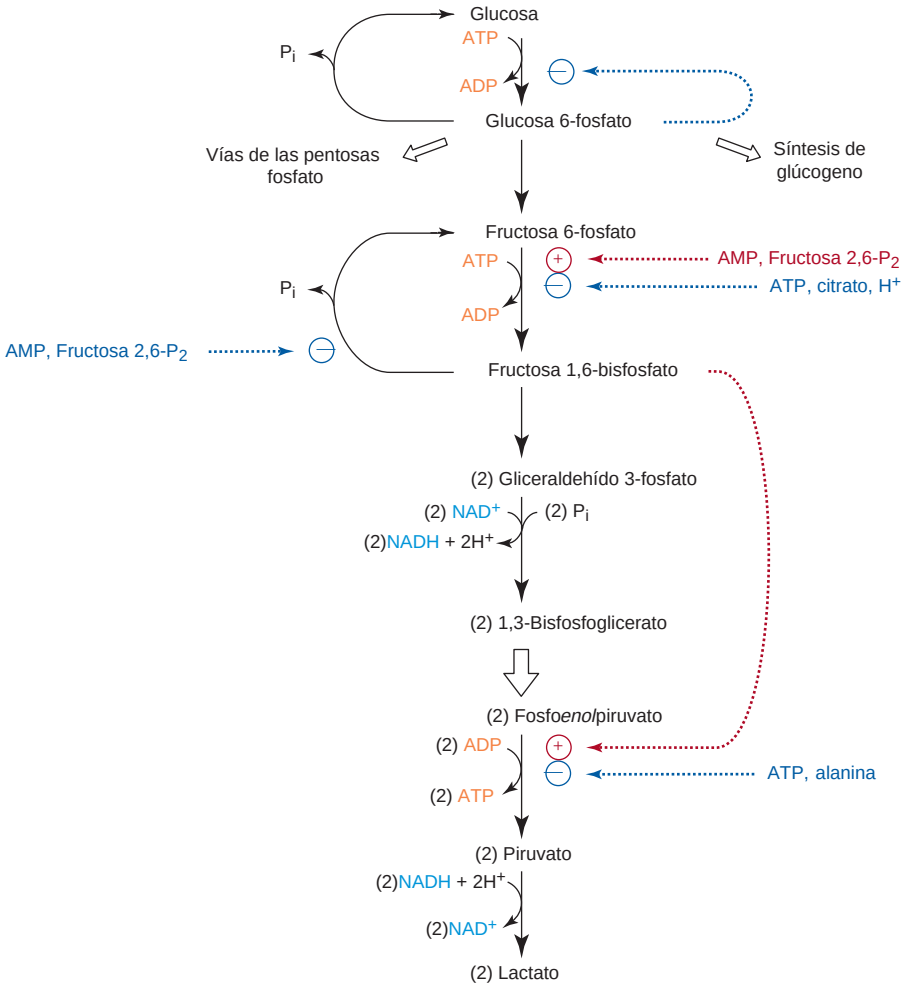
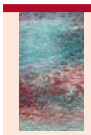


FIGURA 14.13
Aspectos reguladores importantes de la vía glucolítica.
Debido a diferencias tisulares en la expresión de isoenzimas, no todos los tejidos corporales tienen todos los mecanismos reguladores que se muestran en la presente figura.

al equilibrio, y en tal caso se considera que probablemente el enzima no está sujeto a regulación. Cuando el cociente según la ley de acción de masas es considerablemente diferente de K_{eq}, se dice que el enzima cataliza una reacción desplazada del equilibrio, y, en ese caso está habitualmente sujeto a regulación por uno o más mecanismos. La comparación de los cocientes según la ley de acción de masas y las constantes de equilibrio de las reacciones catalizadas por los enzimas glucolíticos del hígado indican que la mayoría catalizan reacciones en el equilibrio. Las reacciones catalizadas por la glucoquinasa (isoenzima hepático de la hexoquinasa), la 6-fosfofructo-1-quinasa y la piruvato quinasa del hígado intacto están lejos del equilibrio lo que indica que estos enzimas son sitios probables para la regulación de la glucólisis en este tejido.

La hexoquinasa y la glucoquinasa tienen propiedades diferentes

En diferentes tejidos corporales se encuentran diferentes isozimas de la **hexoquinasa**. Los isozimas de la hexoquinasa de muchos tejidos tienen una K_m baja para la glucosa (<0,1 mM) en relación con su concentración en la sangre (~5 mM), y son fuertemente inhibidos por el producto de la reacción, la glucosa 6-fosfato (G6P). Esta acción, es una faceta reguladora importante, ya que impide que la hexoquinasa ligue todo el P_i de una célula en forma de hexosas fosforiladas (véase Apli. Clín. 14.3). Así, la reacción catalizada por la hexoquinasa puede no estar en equilibrio en las células que contienen este enzima, debido a la inhibición impuesta por la G6P. Las células del parénquima hepático son especiales, ya que contienen **glucoquinasa**, un



APLICACIÓN CLÍNICA 14.3
Intolerancia a la fructosa

Los pacientes con intolerancia hereditaria a la fructosa sufren una deficiencia de la aldolasa hepática, responsable de la escisión de la fructosa 1-fosfato en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído. El consumo de fructosa por estos pacientes da lugar a la acumulación de fructosa 1-fosfato y a la desaparición de P_i y ATP del hígado. Las reacciones involucradas son las catalizadas por la fructoquinasa y los enzimas de la fosforilación oxidativa:

$$\text{fructosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{fructosa 1-fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + P_i + \text{“energía proporcionada por la cadena de transferencia”} \rightarrow \text{ATP}$$

$$\text{Neto:} \quad P_i + \text{fructosa} \rightarrow \text{fructosa 1-fosfato}$$

La inmovilización del P_i en forma de fructosa 1-fosfato impide a las mitocondrias hepáticas la generación de ATP por la fosforilación oxidativa. Los niveles de ATP caen rápidamente, lo que imposibilita al hígado el desarrollar sus funciones de trabajo normales. Las células quedan principalmente dañadas porque no pueden mantener los gradientes iónicos normales por medio de las bombas catiónicas dependientes de ATP. Las células se hinchan y finalmente pierden su contenido interno por lisis osmótica.

Aunque los pacientes con intolerancia a la fructosa son especialmente sensibles a la fructosa, el hombre en general posee una capacidad limitada para actuar sobre este azúcar. La capacidad del hígado normal para fosforilar la fructosa es muy superior a su capacidad para romper la fructosa 1-fosfato. Esto significa que la utilización de la fructosa por el hígado está controlada de forma muy deficiente, y que el exceso de fructosa podría dejar al hígado sin P_i ni ATP. Durante un tiempo, se probó en los hospitales el sustituir la glucosa por fructosa en los pacientes que debían ser mantenidos por nutrición parenteral. La idea era que la fructosa sería una mejor fuente de calorías que la glucosa, ya que la utilización de fructosa es relativamente independiente del estatus respecto a la insulina de un paciente. Pronto se halló que la administración de grandes cantidades de fructosa mediante nutrición intravenosa daba lugar a una lesión grave del hígado. Se han realizado intentos similares para sustituir la glucosa por sorbitol y xilitol. Estos azúcares también tienden a agotar el ATP hepático, por lo que, al igual que la fructosa, no deberían utilizarse en la nutrición parenteral.

Gitzelmann, R., Steinmann, B. y Van den Berghe, G. Disorders of fructose metabolism. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, pp. 905–934; y Ali, M., Rellos, P y Cox T. M. Hereditary fructose intolerance. *J. Med.* Genet. 35:353, 1998.

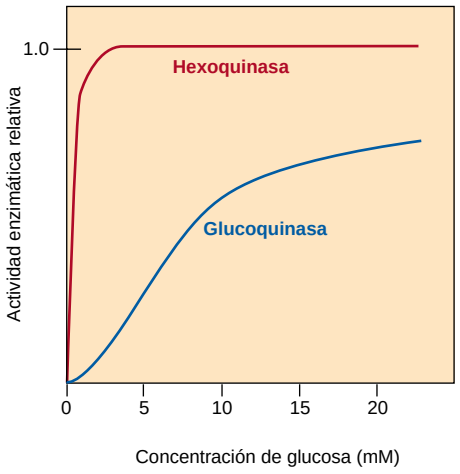


FIGURA 14.14
Comparación de las curvas de saturación de sustrato de la hexoquinasa y de la glucoquinasa.

isozima de la hexoquinasa con propiedades cinéticas muy diferentes de las otras hexoquinasas. Este isozima cataliza una fosforilación de la glucosa dependiente de ATP como las otras hexoquinasas, pero tiene una $S_{0,5}$ (concentración de sustrato que da una actividad enzimática igual a la mitad de la velocidad máxima) para la glucosa mucho mayor que las demás hexoquinasas (Figura 14.14). Además, la glucoquinasa no está sujeta a inhibición por G6P. La curva de saturación para la glucoquinasa es **sigmoidea** (véase Figura 14.14); es decir, se observa **cooperatividad** en función de la concentración de glucosa y, por consiguiente, no sigue cinética sencilla de Michaelis-Menten (véase p. 422). La cinética de la glucoquinasa se describe, por tanto, en téminos de $S_{0,5}$ y no mediante un valor de K_m para la glucosa. Aunque la glucoquinasa no es inhibida por G6P como las otras hexoquinasas, su actividad es sensible a la inhibición indirecta por la fructosa 6-fosfato, que se encuentra un paso más adelante y en equilibrio con G6P. Estos efectos dependen de una proteína reguladora de la glucoquinasa que, de modo sorprendente, está localizada en el núcleo de las células hepáticas (Figura 14.15). Funciona secuestrando a la glucoquinasa en forma de complejo inactivo en el núcleo. Así, la fructosa 6-fosfato favorece la unión de la glucoquinasa a la proteína inhibidora mediante un mecanismo alostérico inhibiendo, de este modo, la glucoquinasa. La fructosa 6-fosfato, de hecho, promueve la translocación de la glucoquinasa desde el citosol al núcleo en donde la glucoquinasa es inhibida completamente por la proteína reguladora (véase Figura.14.15). Este efecto inhibidor de la fructosa 6-fosfato sobre la glucoquinasa es contrarrestado por la glucosa y puede ser superado completamente por un aumento sufiecientemente grande en la concentración de glucosa. De nuevo, y mediante un mecansimo alostérico, la glucosa desencadena la disociación de la glucoquinasa de la proteína reguladora con lo que promueve la translocación de la glucoquinasa desde el núcleo al citosol en donde puede expresar su actividad catalítica (véase Figura 14.15). Todas estas características reguladoras especiales de la glucoquinasa (alta $S_{0,5}$ de la glucoquinasa para la glucosa, cooperatividad con respecto a la concentración de glucosa y translocación estimulada por la glucosa desde el núcleo al citosol) contribuyen a la capacidad que tiene el hígado de “tamponar” los niveles sanguíneos de glucosa. Debido a que la glucosa se equilibra rápidamente a través de la membrana plasmática del hígado, gracias a la presencia en las células hepáticas del transportador de glucosa GLUT-2, con lo que la concentración dentro del hígado es

reflejo de la existente en la sangre. Dado que la $S_{0,5}$ de la glucoquinasa para la glucosa (~7 mM) es considerablemente mayor que las concentraciones normales de la glucosa en sangre (~5 mM) y que la glucosa promueve la translocación de la glucoquinasa desde el núcleo al citosol, cualquier incremento en la concentración de glucosa en la sangre de la vena porta sobre la normal conduce a un incremento espectacular de la velocidad de fosforilación de la glucosa por la glucoquinasa en el hígado (Figuras 14.14 y 14.15). De modo semejante, cualquier disminución en la concentración de glucosa conduce a una disminución importante en la velocidad de fosforilación de la glucosa. El resultado es que el hígado sólo utiliza la glucosa a una velocidad significativa sólo cuando los niveles de glucosa sanguíneos son muy elevados y deja de actuar cuando los niveles de glucosa sanguínea son bajos. Este efecto tamponador de la glucoquinasa hepática sobre los niveles de glucosa sanguínea no tendría lugar si la glucoquinasa tuviese la baja K_m para la glucosa característica de las otras hexoquinasas y si estuviese, por lo tanto, completamente saturada a concentraciones fisiológicas de glucosa (Figura 14.14). Por otro lado, una forma de la hexoquinasa con una K_m baja es una buena elección para tejidos como el cerebro, puesto que permite la fosforilación de la glucosa incluso cuando las concentraciones de glucosa en la sangre y en el tejido sean peligrosamente bajas.

La reacción catalizada por la glucoquinasa no se halla cerca del equilibrio en las condiciones intracelulares de las células hepáticas. La explicación se encuentra en la restricción de velocidad impuesta por la alta $S_{0,5}$ de la glucoquinasa para la glucosa y a la inhibición de la actividad glucoquinasa por la proteína reguladora. Otro factor adicional importante es que la actividad de la glucoquinasa está contrarrestada en el hígado por la actividad de la **glucosa 6-fosfatasa**. Al igual que la glucoquinasa, este enzima tiene una K_m elevada (3 mM) con respecto a la concentración intracelular normal (~0,2 mM) de su sustrato primario, la glucosa 6-fosfato. El resultado es que el flujo a través de este paso es casi directamente proporcional a la concentración intracelular de glucosa 6-fosfato. Tal como se muestra en la Figura 14.16, la acción combinada de la glucoquinasa y la glucosa 6-fosfatasa constituye un ciclo inútil, esto es, la suma de sus reacciones es simplemente la hidrólisis de ATP a ADP y P_i, sin realización de trabajo alguno. Cuando las concentraciones de glucosa sanguínea son alrededor de 5 mM, la actividad de la glucoquinasa está prácticamente contrarrestada por la actividad en sentido contrario de la glucosa 6-fosfatasa. El resultado es que no hay flujo neto en ninguna de las dos direcciones. Esta conversión inútil entre glucosa y glucosa 6-fosfato derrocha ATP pero, combinada con el proceso de la gluconeogénesis, contribuye de modo significativo a la acción "tamponadora" del hígado sobre los niveles de glucosa sanguínea. Además, proporciona un mecanismo para impedir que la glucoquinasa ligue todo el P_i del hígado (véase Apli. Clín. 14.3).

La **fructosa**, un componente de muchos vegetales, frutas y edulcorantes, favorece la utilización de la glucosa hepática a través de un mecanismo indirecto. En el hígado, la fructosa se convierte en **fructosa 1-fosfato** (véase Apli. Clín. 14.3), que estimula la actividad de la glucoquinasa al tener el efecto opuesto de la fructosa 6-fosfato sobre la fijación de la glucoquinasa a su proteína reguladora; es decir, la fructosa 1-fosfato favorece la disociación y, por tanto, la translocación fuera del núcleo y la activación de la glucoquinasa. Esta puede ser una de las causas de los efectos negativos, por ejemplo la **hipertriacilglicerolemia** que, en ocasiones, está relacionada con un consumo excesivo de fructosa en la dieta.

La **glucoquinasa** es también **un enzima inducible**. En diversas condiciones fisiológicas aumenta o disminuye la cantidad de enzima. La inducción y la represión de la síntesis de un enzima son procesos relativamente lentos que requieren habitualmente varias horas antes de que se produzcan cambios significativos. La **insulina** aumenta la cantidad de glucoquinasa, ya que favorece la transcripción del gen de ésta. Un aumento de los niveles de glucosa en sangre ocasiona un aumento de la liberación de insulina por las células β del páncreas. Como resultado, los nive-

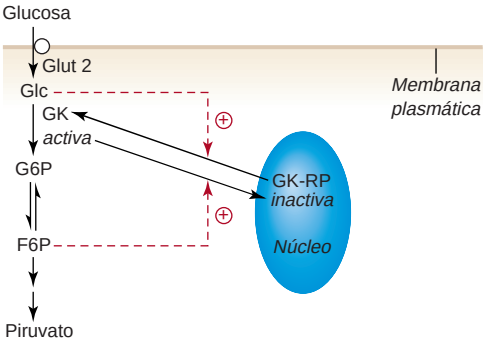


FIGURA 14.15
La actividad glucoquinasa está regulada por translocación del enzima entre el citoplasma y el núcleo.
La glucosa aumenta la actividad glucoquinasa (GK) promoviendo su translocación al citoplasma. La fructosa 6-fosfato disminuye la GK al estimular su translocación al núcleo. La unión a su proteína reguladora (RP) en el núcleo inhibe completamente la actividad GK.

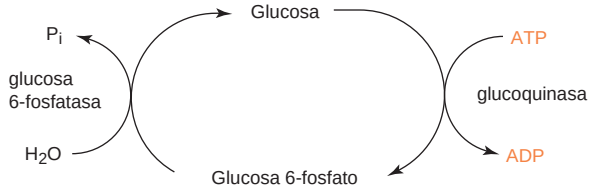
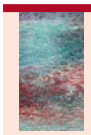


FIGURA 14.16
La fosforilación de la glucosa seguida por su desfosforilación constituye un ciclo fútil en las células parenquimáticas del hígado.



APLICACIÓN CLÍNICA 14.4

Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por trastornos en el metabolismo de glúcidos, grasas y proteínas. Clínicamente se reconocen dos tipos principales: la de tipo 1 o dependiente de insulina (véase Apli. Clín. 20.8) y la de tipo 2 o independiente de insulina (véase Apli. Clín. 20.7).

La prueba de tolerancia oral a la glucosa se utiliza comúnmente para el diagnóstico de la diabetes en enfermos a quienes el ayuno no les produce hiperglucemia. Consiste en la determinación del nivel de glucosa sanguínea en el estado de ayuno y a intervalos de 30–60 minutos durante 2 horas o más después de consumir una comida de 100 gramos de glúcido. En un individuo normal la glucosa sanguínea vuelve a sus niveles normales al cabo de dos horas de la ingestión de la comida glucídica. En el diabético la glucosa sanguínea alcanza un nivel más elevado y permanece elevada durante períodos de tiempo más largos, según la gravedad de la enfermedad. No obstante, hay muchos factores que pueden contribuir a una prueba de tolerancia anormal a la glucosa. El paciente ha de haber consumido una dieta con alto contenido glucídico durante los 3 días anteriores, probablemente para permitir la inducción de los enzimas de las rutas utilizadoras de glucosa como, por ejemplo, glucoquinasa, ácido graso sintasa y acetil CoA carboxilasa. Además, casi cualquier infección (incluso un resfriado) y el menos bien definido estrés (posiblemente por efectos sobre el sistema nervioso simpático) pueden dar lugar a anormalidades (transitorias) de la prueba de tolerancia a la glucosa. Debido a los problemas citados, el diagnóstico *sine qua non* para la diabetes debería ser la elevación del nivel de glucosa en ayunas. En el estado diabético disminuye la captación de glucosa por los tejidos sensibles a la insulina, esto es, músculo y tejido adiposo. La insulina es necesaria para la captación de glucosa por estos tejidos y el diabético o bien carece de insulina o ha desarrollado "resistencia a la insulina" en estos tejidos. La resistencia a la insulina es una anomalía del receptor de insulina o en pasos posteriores que intervienen en el efecto metabólico de la insulina. Las células parenquimáticas del hígado no requieren insulina para la captación de glucosa. Sin embargo, sin insulina el hígado tiene disminuida la capacidad enzimática para extraer glucosa de la sangre. Esto se explica en parte por una actividad disminuida de la glucoquinasa y la pérdida de actividad de la insulina sobre otros enzimas clave de la gluconeogénesis y la vía glucolítica.

Taylor, S. I. Diabetes mellitus. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, pp. 843–896.

les de insulina en sangre aumentan, lo que promueve la transcripción del gen de la glucoquinasa y aumenta la cantidad de proteína del enzima glucoquinasa en el hígado. De este modo, la cantidad de glucoquinasa en el hígado refleja la cantidad de glucosa que llega al hígado vía vena porta. Dicho de otro modo, una persona que consuma grandes cantidades de comida rica en glúcidos contiene mayores cantidades de glucoquinasa en el hígado que quien no. El hígado en el que se ha inducido la glucoquinasa puede contribuir en mayor proporción a disminuir los valores elevados de glucosa sanguínea. La ausencia de insulina hace que el hígado del paciente diabético presente un déficit de glucoquinasa, a pesar de los elevados niveles de glucosa en sangre, siendo ésta una de las razones por las que el hígado de los diabéticos tiene una menor acción "tamponante" de la glucosa sanguínea (véase Apli. Clín. 14.4). La diabetes de aparición madura en los jóvenes (*m*aturity-*o*nset *d*iabetes of the *y*oung: MODY) que es una forma de diabetes mellitus tipo 2, está producida por defectos en el gen que codifica la glucoquinasa

La 6-fosfofructo-1-quinasa es un sitio regulador importante en la glucólisis

Hay muchos datos que apuntan a que la **6-fosfofructo-1-quinasa** es un punto de regulación principal de la glucólisis en la mayoría de los tejidos. Normalmente, tendemos a pensar que el punto más idóneo para ser el paso limitante de velocidad de una ruta, es el primer paso. No obstante, el paso que compromete el carbono a una ruta es el más apropiado para ser un punto de control importante, y la 6-fosfofructo-1-quinasa cataliza el primer paso comprometido de la ruta glucolítica. Esto es así porque la reacción catalizada por la fosfoglucoisomerasa es reversible, y todas las células pueden utilizar la glucosa 6-fosfato en la vía de las pentosas fosfato y muchas la utilizan en la síntesis de glucógeno. La reacción catalizada por la 6-fosfofructo-1-quinasa compromete a la célula a metabolizar la glucosa a través de la glucólisis y, por tanto, es un punto lógico para ser objeto de regulación por efectores alostéricos. Los efectores alostéricos negativos más importantes son el **citrato**, el **ATP** y los **iones hidrógeno** (pH bajo), mientras que el **AMP** y la **fructosa 2,6-bisfosfato** constituyen los principales efectores alostéricos positivos (Figura 14.13). Estos compuestos, que actúan como activadores o inhibidores fuertes de la 6-fosfofructo-1-quinasa, modulan la velocidad de la glucólisis en respuesta a cambios en (1) el estado energético de la célula (ATP y AMP), (2) el ambiente interno de la célula (iones hidrógeno), (3) la disponibilidad de combustibles alternativos tales como ácidos grasos y cuerpos cetónicos (citrato), y (4) la relación sanguínea de insulina a glucagón (fructosa 2,6-bisfosfato).

Regulación de la 6-fosfofructo-1-quinasa por el ATP y el AMP

El **efecto Pasteur** se refiere a la inhibición de la utilización de glucosa y de la acumulación de lactato que tiene lugar cuando se inicia la respiración (consumo de oxígeno) en una suspensión de células o en un tejido. Esto es fácilmente comprensible sobre una base termodinámica, ya que la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y H_2O produce mucho más ATP que la glucólisis anaeróbica:

$$\text{Glucólisis:} \quad \text{D-glucosa} + 2\ ADP^{3-} + 2\ P_i^{2-} \rightarrow 2\ \text{L-lactato}^- + 2\ ATP^{4-}$$

$$\text{Oxidación completa:} \quad \text{D-glucosa} + 6\ O_2 + 32\ ADP^{3-} + 32\ P_i^{2-} + 32\ H^+ \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 32\ ATP^{4-}$$

El ATP es utilizado por la célula para satisfacer su demanda metabólica, esto es, para proporcionar la energía necesaria para los procesos de trabajo inherentes. Dado que en presencia de oxígeno se produce mucho más ATP a partir de glucosa, se necesita entonces consumir mucha menos glucosa para satisfacer la demanda metabólica de la célula. Esto ocurre, en parte, mediante inhibición de la glucólisis por el ATP a nivel de la 6-fosfofructo-1-quinasa. Esto se puede racionalizar fácilmente sobre la base de que el ATP es un inhibidor bien caracterizado de la 6-fosfofructo-1-quinasa y de que se produce más ATP en presencia de oxígeno que en ausencia del mismo. Sin embargo, a menudo los niveles de ATP no varían demasiado entre dos condiciones en las que el flujo glucolítico está muy alterado. Como la 6-fosfofructo-1-quinasa está fuertemente inhibida a la concentración de ATP normalmente presente en las células (2,5 a 6 mM), una pequeña diferencia en la concentración de ATP no puede justificar completamente el gran cambio de flujo a través de la 6-fosfofructo-1-quinasa. Sin embargo, cambios mucho mayores, considerados en porcentaje, tienen lugar en las concentraciones de AMP, un efector alostérico positivo de la 6-fosfofructo-1-quinasa. El cambio que tiene lugar en las concentraciones de estado estacionario de AMP cuando se introduce oxígeno en el sistema es exactamente el que podía preverse, esto es, que el nivel desciende espectacularmente. Esto provoca una disminución en la actividad de la 6-fosfofructo-1-quinasa, lo que suprime fuertemente la actividad glucolítica y justifica en gran medida el efecto Pasteur. Cuando aumentan los niveles de ATP, disminuyen automáticamente los de AMP. La razón es que la suma de los nucleótidos de adenina en una célula, esto es, ATP + ADP + AMP, es casi constante en la mayor parte de condiciones fisiológicas, pero las concentraciones relativas son tales que la concentración de ATP es siempre mucho mayor que la concentración de AMP. Además, los nucleótidos de adenina se mantienen en equilibrio en el citosol mediante la acción de la **adenilato quinasa** (también denominada **mioquinasa**), que cataliza la reacción 2 ADP → ATP + AMP. La constante de equilibrio (K'_{eq})de esta reacción viene dada por

$$K'_{eq} = \frac{[ATP][AMP]}{[ADP]^2}$$

Dado que esta reacción se encuentra "próxima al equilibrio" en condiciones intracelulares, la concentración de AMP viene dada por

$$[AMP] = \frac{K'_{eq}[ADP]^2}{[ATP]}$$

Debido al hecho de que, intracelularmente, [ATP] >> [ADP] >> [AMP], una pequeña disminución de [ATP] produce un incremento sustancialmente mayor en porcentaje de la [ADP] y, puesto que la [AMP] es proporcional al cuadrado de la [ADP], un incremento aún mayor de la [AMP]. Debido a esta relación, un pequeño descenso en la concentración de ATP se amplifica a un cambio mucho mayor, porcentualmente, de la [AMP] que la disminución porcentual de la [ATP]. Esto hace que la [AMP] sea una excelente señal del **estado energético** de la célula, y le permite funcionar como un efector alostérico de la actividad 6-fosfofructo-1-quinasa. Aún más, la [AMP] también influye de otra manera sobre la efectividad de la 6-fosfofructo-1-quinasa. El enzima **fructosa 1,6-bisfosfatasa** cataliza una reacción irreversible que se opone a la de la 6-fosfofructo-1-quinasa:

$$\text{fructosa 1,6-bisfosfato} + H_2O \rightarrow \text{fructosa 6-fosfato} + P_i$$

Este enzima se encuentra al lado mismo de la 6-fosfofructo-1-quinasa en el citosol de muchas células. Conjuntamente, catalizan un ciclo inútil (ATP + H_2O → ADP +

P_i + "calor") y, como mínimo, disminuyen mutuamente su "efectividad". La concentración de AMP es un perfecto sensor del estado energético de la célula, no sólo porque el AMP activa la 6-fosfofructo-1-quinasa, sino porque el AMP también inhibe la fructosa 1,6-bisfosfatasa. Así, un pequeño descenso en la concentración de ATP pone en funcionamiento, a través del incremento de la concentración de AMP que, en términos porcentuales es mucho mayor, un gran incremento en la conversión neta de fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato. Esto incrementa el flujo glucolítico, al incrementar la cantidad de sustrato disponible para la fase de partición. En las células que contienen hexoquinasa se produce también una mayor fosforilación de glucosa, debido a que un descenso de fructosa 6-fosfato conduce automáticamente a una disminución de glucosa-6-fosfato, la cual, a su vez, hace que haya una menor inhibición de la hexoquinasa.

La disminución en la producción de lactato en respuesta al inicio de la respiración es otra característica del efecto Pasteur que se puede explicar fácilmente. El factor más importante es el menor flujo glucolítico causado por el oxígeno. Otros factores incluyen la competencia entre la lactato deshidrogenasa y el complejo de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial por el piruvato, así como la competencia entre la lactato deshidrogenasa y los sistemas de lanzadera por el NADH. En su mayor parte, la lactato deshidrogenasa pierde la competición en presencia de oxígeno.

El pH intracelular puede regular la 6-fosfofructo-1-quinasa

Sería natural esperar que el lactato, producto final de la glucólisis, inhibiera el enzima regulador de la vía glucolítica. Pero no es así. Sin embargo, los **iones hidrógeno**, también producto final de la glucólisis, sí inhiben la 6-fosfofructo-1-quinasa. Tal como se muestra en la Figura 14.17, la glucólisis genera, en efecto, **ácido láctico**, de modo que la célula debe eliminarlo como tal. Esto explica por qué la glucólisis excesiva en el cuerpo disminuye el pH sanguíneo y conduce a una situación médica de emergencia denominada **acidosis láctica** (véase Apli. Clín. 14.5). Las membranas plasmáticas de las células contienen un transportador paralelo para protones y lactato. Esto permite la liberación de ácido láctico al torrente circulatorio. Este es un mecanismo de defensa que impide que el pH descienda lo suficiente como para que se aci-

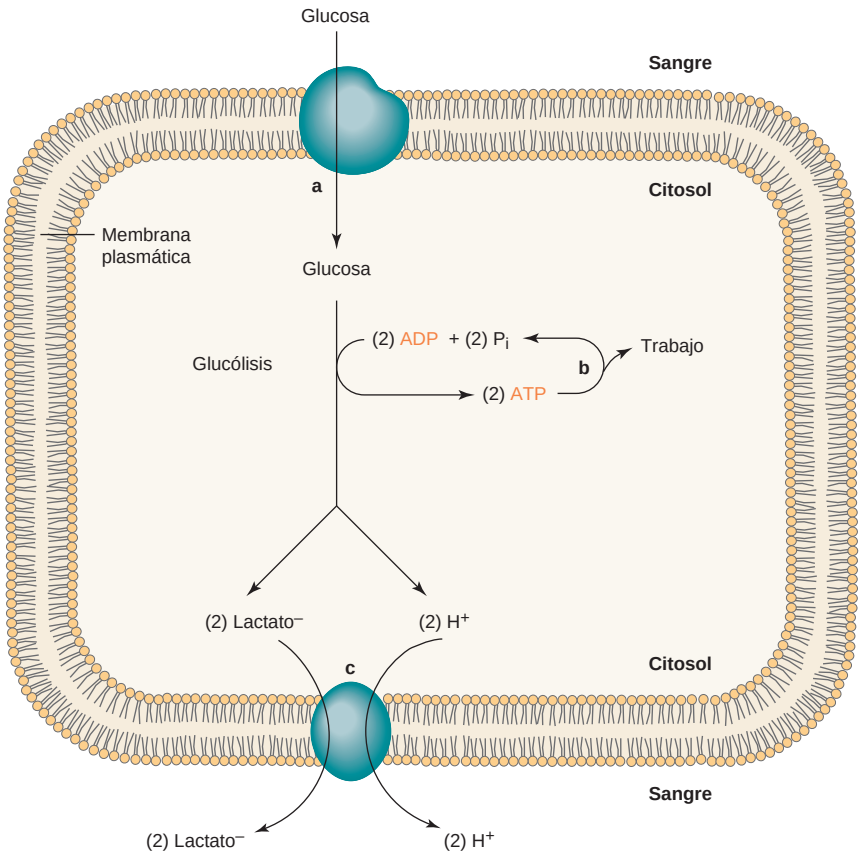
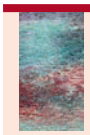


FIGURA 14.17
A menos que el lactato formado por la glucólisis se transporte fuera de la célula, el pH intracelular descenderá como consecuencia de la acumulación intracelular de ácido láctico.
El pH bajo disminuye la actividad 6-fosfofructo-1-quinasa, de manera que la subsiguiente producción de ácido láctico por la glucólisis queda interrumpida. (*a*) Transporte de glucosa al interior de la célula. (*b*) Todas las actuaciones de trabajo que vuelven a convertir el ATP en ADP y P_i. (*c*) Transporte paralelo del lactato–ion hidrógeno (estequiometría real de un lactato$^-$ y un H^+ por cada transporte paralelo).



APLICACIÓN CLÍNICA 14.5
Acidosis láctica

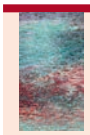
Este problema se caracteriza por la presencia de niveles sanguíneos de lactato elevados, normalmente superiores a 5 mM, junto con un pH sanguíneo disminuido y concentraciones de bicarbonato más bajas. La acidosis láctica es la forma de acidosis metabólica más frecuente y puede ser consecuencia de sobreproducción de lactato, infrautilización de lactato, o de ambas a la vez. Normalmente, la producción de lactato está equilibrada por la utilización del mismo, con el resultado de que el lactato no se encuentra normalmente presente en la sangre a concentraciones superiores a 1,2 mM. Todos los tejidos corporales poseen la capacidad de producir lactato mediante glucólisis anaeróbica, si bien la mayoría de ellos no lo producen en grandes cantidades, debido a que pueden obtener mucho más ATP mediante oxidación completa del piruvato producido por la glucólisis. Sin embargo, cuando la oxigenación es inadecuada, todos los tejidos responden con un incremento en la generación de lactato. El descenso en ATP producido por la reducción de la fosforilación oxidativa permite que aumente la actividad de la 6-fosfofructo-1-quinasa. Estos tejidos se han de basar en la glucólisis anaeróbica para la producción de ATP, lo que en estas condiciones da lugar a la producción de ácido láctico. Un buen ejemplo de ello es el ejercicio muscular, que puede agotar el oxígeno tisular y dar así lugar a la sobreproducción de ácido láctico. Sin embargo, la hipoxia tisular se da en todas las formas de shock, en las convulsiones y en las enfermedades debidas a fallos circulatorios y pulmonares.

El principal destino del lactato en el cuerpo es, o bien su combustión completa a CO_2 y H_2O, o bien su reconversión en glucosa mediante el proceso de la gluconeogénesis. Ambos requieren oxígeno. La disminución en la disponibilidad de oxígeno incrementa, por tanto, la producción de lactato, a la vez que disminuye su utilización. Esta última también se puede producir por enfermedades hepáticas, etanol y un buen número de fármacos. La fenformina, fármaco que durante un tiempo se utilizó para tratar la hiperglucemia de la diabetes dependiente de insulina, induce acidosis láctica en ciertos pacientes.

Normalmente, se administra bicarbonato para intentar controlar la acidosis asociada a la acumulación de ácido láctico. La clave para un tratamiento con éxito es, sin embargo, encontrar y eliminar la causa de la superproducción y/o infrautilización de ácido láctico, lo que, muy a menudo, implica la restauración de la circulación de sangre oxigenada.

Newsholme, E. A. y Leech, A. R. *Biochemistry for the Medical Sciences.* New York: Wiley, 1983; y Kruse, J. A. y Carlson, R. W. Lactate metabolism. *Crit. Care Clin.* 3:725, 1985.

difique todo el conjunto (véase Apli. Clín. 14.6). La sensibilidad de la 6-fosfofructo-1-quinasa a los iones hidrógeno es también parte de este mecanismo. Los iones hidrógeno son capaces de detener la glucólisis, proceso responsable de la disminución del pH. El transporte del ácido láctico fuera de la célula exige que haya sangre asequible a la célula para que ésta pueda eliminarlo. Cuando el flujo sanguíneo es inadecuado, por ejemplo, durante el ejercicio intenso de un músculo esquelético, o en un ataque de **angina de pecho** en el caso del corazón, los iones hidrógeno no pueden escapar de las células de forma suficientemente rápida. Sin embargo, la necesidad de ATP en tales células puede superar parcialmente la inhibición de la 6-fosfo-



APLICACIÓN CLÍNICA 14.6
Cerdo en escabeche e hipertermia maligna

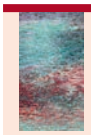
Existen una serie de agentes, especialmente el muy utilizado anestésico local halotano, que producen una elevación espectacular de la temperatura corporal, acidosis metabólica y respiratoria, hiperpotasemia y rigidez muscular en los pacientes con hipertermia maligna. Esta anormalidad genética se da en uno de cada 15 000 niños y en uno de cada 50 000–100 000 adultos. Se hereda de forma dominante. Puede producir la muerte la primera vez que una persona susceptible es anestesiada. La aparición tiene lugar durante los primeros minutos de exposición al fármaco, lo que hace que la hipertermia deba ser inmediatamente reconocida. Una medida efectiva es envolver al paciente en hielo y tomar disposiciones para combatir la acidosis. También es efectivo el fármaco dantroleno.

En los cerdos también se produce un fenómeno similar, si no idéntico, a la hipertermia maligna. Los cerdos con este problema, conocido como el síndrome del estrés porcino, responden mal al estrés. Esta enfermedad genética se manifiesta normalmente cuando el cerdo es trasladado al mercado. Se pueden identificar los cerdos con el síndrome al exponerlos al halotano, el cual desencadena la misma respuesta observada en los pacientes con hipertermia maligna. La carne de los cerdos muertos a resultas del síndrome es pálida, insípida y con un pH muy bajo (es decir, casi en escabeche (vinagre)).

Se considera que el músculo es el punto de la lesión primaria, tanto en la hipertermia maligna como en el síndrome del estrés porcino. Los músculos esqueléticos, en respuesta al halotano, se vuelven rígidos y generan calor y ácido láctico. El retículo sarcoplasmático de estos cerdos y pacientes tiene una anormalidad genética en el receptor ryanodino, un canal de liberación de Ca^{2+}, que desempeña un importante papel en el acoplamiento excitación–contracción en el músculo. Debido a un defecto en esta proteína, el anestésico desencadena una liberación errónea de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático. Esto se traduce en una estimulación incontrolada de varios procesos que generan calor, que incluyen la miosina-ATPasa, la glucogenólisis, la glucólisis, y la absorción y liberación cíclicas de Ca^{2+} por las mitocondrias y el retículo sarcoplasmático.

Las células musculares resultan dañadas de forma irreversible como consecuencia de la excesiva producción de calor, acidosis láctica y pérdida de ATP.

Kalow, W. y Grant, D. M. Pharmacogenetics. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, pp. 293–326; y McCarthy T. V., Quane, K. A. y Lynch P. J. Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum. Mutat.* 15:410, 2000.



APLICACIÓN CLÍNICA 14.7

Angina de pecho e infarto de miocardio

El dolor pectoral relacionado con una isquemia miocárdica reversible se denomina angina de pecho (literalmente dolor estrangulante de pecho). El dolor es el resultado del desequilibrio entre la demanda y el suministro de flujo sanguíneo a los músculos cardíacos, y en la mayoría de las ocasiones está causado por el estrechamiento de las arterias coronarias. El paciente experimenta una fuerte presión o dolor subesternal que a menudo irradia hacia el hombro o hacia el brazo o, en ocasiones, a la mandíbula o al cuello. Los ataques tienen lugar con el esfuerzo excesivo, duran entre 1 y 15 minutos, y se alivian con el descanso. Las arterias coronarias implicadas se obstruyen por aterosclerosis (es decir, están forradas con depósitos grasos característicos) o, menos frecuentemente, son constreñidas por un espasmo. El infarto de miocardio tiene lugar si la isquemia persiste durante el tiempo suficiente como para causar un daño grave (necrosis) al músculo cardíaco. Por lo general, se forma un coágulo de sangre en el lugar donde se produce el estrechamiento que obstruye completamente el vaso sanguíneo. En el infarto de miocardio se produce muerte tisular y el dolor característico es más duradero y, a menudo, más grave.

Para aliviar el dolor producido por la isquemia miocárdica de la angina de pecho, se recetan frecuentemente la nitroglicerina y otros nitratos. Estos fármacos se pueden utilizar profilácticamente, permitiendo participar a los pacientes en actividades que, a falta de ellos, les precipitarían un ataque de angina. Puede que la nitroglicerina actúe, en parte, causando dilatación de las arterias coronarias, mejorando el suministro de oxígeno al corazón y arrastrando el ácido láctico. Probablemente, el efecto de la nitroglicerina sobre la circulación periférica sea más importante. La descomposición de la nitroglicerina produce óxido nítrico (NO), un compuesto que relaja la musculatura lisa, produciendo venodilatación en todo el cuerpo. Esto reduce la presión arterial y permite que la sangre se acumule en las venas. El resultado de ello es un menor retorno de sangre al corazón y un menor volumen de sangre a bombear por el corazón, lo que disminuye los requerimientos energéticos del mismo. Además, el corazón al vaciarse tiene que vencer una presión menor, lo que también le ahorra energía. El efecto global es una disminución del requerimiento de oxígeno del corazón, poniéndolo a la altura del suministro de oxígeno a través de las arterias coronarias enfermas. Otros agentes útiles son los bloqueadores del canal del calcio, que son vasodilatadores coronarios, así como los bloqueadores β adrenérgicos. Los bloqueadores β impiden que aumente el consumo de oxígeno del miocardio, provocado por la estimulación del músculo cardíaco que lleva a cabo el sistema nervioso simpático. Dicha estimulación se produce cuando se realiza un esfuerzo físico.

La operación de rodeo (*bypass*) de la arteria coronaria se utiliza en casos graves de angina que no pueden ser controlados por medicación. En esta operación, se extraen venas de la pierna y se interponen entre la aorta y las arterias coronarias del corazón. El objetivo de ello es evitar la porción de la arteria dañada por aterosclerosis y proporcionar al tejido afectado un mayor suministro de sangre. Con esta operación se puede conseguir un alivio notable de la angina y, en algunos casos, el paciente puede volver a trabajar con normalidad.

Hugenholtz, P. G. Calcium antagonists for angina pectoris. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 522:565, 1988; Feelishch, M. y Noack, E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 139: 19, 1987; y Ignarro, L. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.* 65: 1, 1989.

fructo-1-quinasa por los iones hidrógeno. La acumulación sostenida de iones hidrógeno produce entonces dolor, el cual en el caso del músculo esquelético puede ser calmado simplemente terminando con el ejercicio. En el caso del corazón, pueden ser efectivos el descanso o agentes farmacológicos que incrementen el flujo sanguíneo o disminuyan la necesidad de ATP dentro de los miocitos (véase Apli. Clín. 14.7).

Los niveles intracelulares de citrato regulan la 6-fosfofructo-1-quinasa

Muchos tejidos prefieren, como combustibles oxidables, ácidos grasos o cuerpos cetónicos en lugar de la glucosa. La mayoría de estos tejidos tienen la posibilidad de utilizar glucosa, pero prefieren de hecho oxidar ácidos grasos y cuerpos cetónicos. Esto ayuda a preservar la glucosa para otros tejidos, tales como el cerebro, que son absolutamente dependientes de la glucosa como fuente de energía. Tanto la oxidación de los ácidos grasos como la de los cuerpos cetónicos eleva los niveles citosólicos de **citrato**, el cual inhibe la 6-fosfofructo-1-quinasa. El resultado de ello es una menor utilización de la glucosa por el tejido cuando hay ácidos grasos o cuerpos cetónicos disponibles.

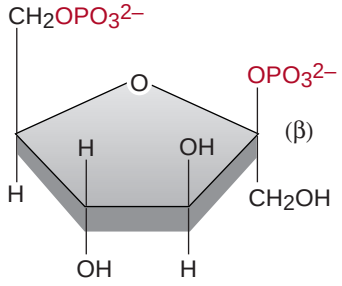


FIGURA 14.18
Estructura de la fructosa 2,6-bifosfato.

Control hormonal de la 6-fosfofructo-1-quinasa por cAMP y fructosa 2,6-bisfosfato

La **fructosa 2,6-bisfosfato** (Figura 14.18), al igual que el AMP, es un efector alostérico positivo de la 6-fosfofructo-1-quinasa y un efector alostérico negativo de la fructosa 1,6-bisfosfatasa. En efecto, en ausencia de este compuesto, la glucólisis no puede producirse en el hígado, porque la 6-fosfofructo-1-quinasa no tiene suficiente actividad y la fructosa 1,6-bisfosfatasa tiene demasiada como para que se produzca una conversión neta de fructosa-6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato.

En la Figura 14.19 se presenta brevemente el papel de la fructosa 2,6-bisfosfato en el control hormonal de la glucólisis hepática. Para comprender este mecanismo, es

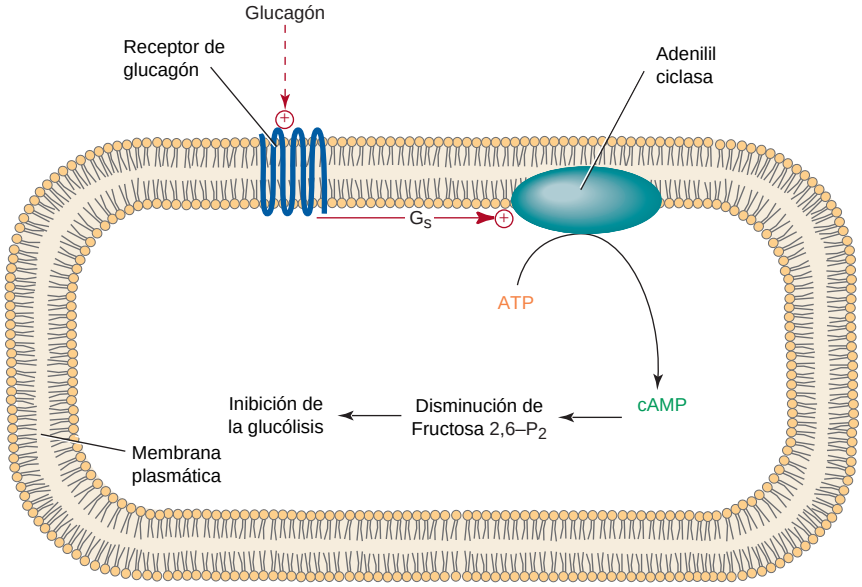


FIGURA 14.19
Visión general del mecanismo responsable de la inhibición por el glucagón de la glucólisis hepática.
La interacción del glucagón con su receptor (una proteína que atraviesa la membrana siete veces) tiene como resultado la activación de la adenilil ciclasa (una proteína intrínseca de membrana) a través de la acción de una proteína-G estimuladora (G_s; también una proteína intrínseca de membrana). El símbolo + indica activación.

preciso hacer hincapié en el papel que el **cAMP** (Figura 14.20) desempeña como "**segundo mensajero**" de la acción hormonal. Tal como se expone detalladamente en el Capítulo 20, las células α pancreáticas liberan glucagón al torrente sanguíneo, donde éste circula hasta que entra en contacto con los receptores de glucagón, situados en la superficie exterior de la membrana plasmática de las células del hígado (Figura 14.19). La unión del glucagón a su receptor es captada por la adenilil ciclasa, enzima situado en la cara interna de la membrana plasmática, y la estimula a convertir ATP en cAMP. El AMP cíclico desencadena una serie de acontecimientos intracelulares que resultan finalmente en una disminución de los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato. La disminución de este compuesto hace que la 6-fosfofructo-1-quinasa pierda en efectividad, pero que la fructosa 1,6-bisfosfatasa la gane, lo que hace que el flujo de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato en la glucólisis disminuya de manera importante.

La fructosa 2,6-bisfosfato no es un intermediario de la glucólisis. Tal como se muestra en la Figura 14.21, la fructosa 2,6-bisfosfato es producida a partir de la F6P por el enzima denominado **6-fosfofructo-2-quinasa**. Existen pues dos "fosfofructoquinasas", una que fabrica un intermediario (fructosa 1,6-bisfosfato) de la ruta glucolítica, y otra que produce un efector alostérico positivo (la fructosa 2,6-bisfosfato) del primer enzima. La fructosa 2,6-bisfosfato puede ser destruida por la fructosa 2,6-bisfosfatasa, convirtiéndola de nuevo en F6P mediante simple hidrólisis (Figura 14.21). En esta reacción no intervienen el ATP ni el ADP. La síntesis y la degradación de la fructosa 2,6-bisfosfato son catalizadas por un **enzima bifuncional**, en el que ambas actividades catalíticas son parte de la misma proteína. De este modo al enzima se le denomina 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa para poner de relieve su capacidad de para sintetizar e hidrolizar la fructosa 2,6-bisfosfato.

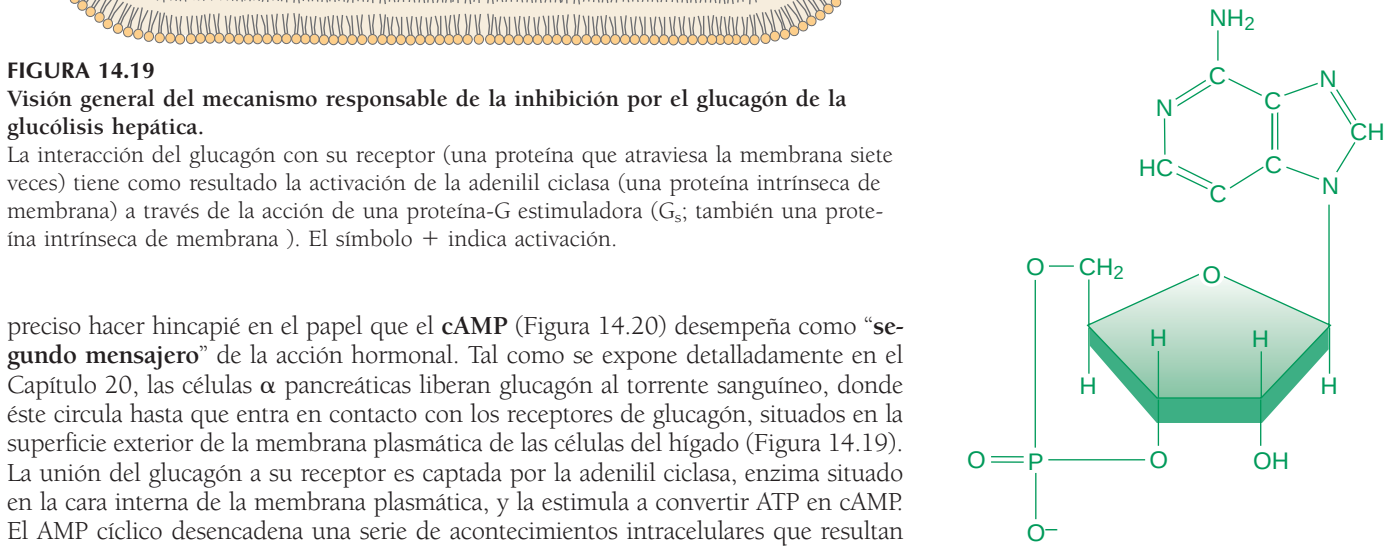


FIGURA 14.20
Estructura del AMP cíclico.

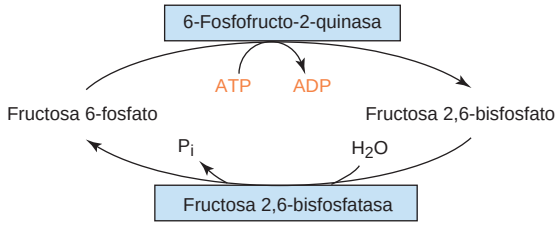


FIGURA 14.21
Reacciones que intervienen en la formación y degradación de la fructosa 2,6-bisfosfato.

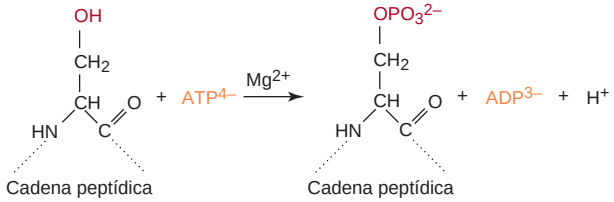


FIGURA 14.22
Los enzimas sujetos a modificación covalente son fosforilados habitualmente en residuos de serina específicos.
Los residuos de tirosina y de treonina son asimismo lugares importantes para la modificación covalente mediante fosforilación.

El cAMP regula los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato en el hígado. ¿Cómo es esto posible si la síntesis y la degradación de esta molécula son efectuadas por el mismo enzima? La respuesta es que existe un mecanismo por el que el cAMP puede, al mismo tiempo, inhibir la actividad quinasa y estimular la actividad fosfatasa de este enzima bifuncional.

El cAMP activa la proteína quinasa A

El cAMP es un activador de la **proteína quinasa A** (también denominada **proteína quinasa dependiente de cAMP**). Este enzima, en su estado inactivo, es un heterotetrámero que consta de dos subunidades reguladoras y de dos subunidades catalíticas. La unión del cAMP a las subunidades reguladoras provoca cambios conformacionales que conducen a la separación de las subunidades catalíticas, que son ahora catalíticamente activas. La proteína quinasa libre cataliza a continuación la fosforilación de residuos de serina específicos presentes en muy diversos enzimas (Figura 14.22).

Una forma adecuada de representar abreviadamente la fosforilación de un enzima es

$$\boxdot + \text{ATP} \longrightarrow \odot\text{-P} + \text{ADP}$$

donde $\boxdot$ y $\odot$-P indican respectivamente las formas desfosforilada y fosforilada del enzima. Se utilizan el círculo y el cuadrado porque la fosforilación provoca un cambio conformacional que afecta al centro activo del enzima. Esta alteración del centro activo incrementa la actividad de algunos enzimas pero disminuye la de otros. La dirección en el cambio de actividad depende del enzima. Muchos enzimas están sujetos a este tipo de regulación, un tipo importante de **modificación covalente** que puede invertirse por simple eliminación del fosfato. Independientemente de que la fosforilación o desfosforilación active al enzima, la forma activa se denomina forma *a* y la inactiva *b*. De la misma manera, independientemente del efecto de la fosforilación en la actividad catalítica, la acción de una proteína quinasa es siempre opuesta a la de una fosfoproteína fosfatasa, que cataliza la reacción

$$\odot\text{-P} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \boxdot + \text{P}_\text{i}$$

En conjunto, ambos crean un **sistema de control cíclico** (Figura 14.23) en el que la relación de enzima fosforilado a enzima desfosforilado depende de las actividades relativas de la proteína quinasa y de la fosfoproteína fosfatasa. Si la quinasa tiene mayor actividad que la fosfatasa, entonces habrá más enzima en forma fosforilada, y viceversa. Puesto que la actividad depende de si se encuentra en la forma fosforilada o desfosforilada, las actividades relativas de la quinasa y la fosfatasa determinan la cantidad relativa de un enzima particular que se encuentra en el estado catalíticamente activo.

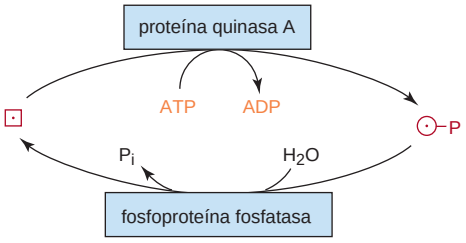


FIGURA 14.23
Modelo general del mecanismo de regulación de enzimas por fosforilación/desfosforilación.
Los símbolos ⊡ y ⊙-P indican que como resultado de la fosforilación/desfosforilación del enzima se forman diferentes estados conformacionales y de actividad.

La 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa está regulada por fosforilación–desfosforilación

Muchos enzimas se activan o inactivan por fosforilación, pero en el caso de la **6-fosfofructo-2- quinasa** y la **fructosa 2,6-bisfosfatasa** se aprovecha la naturaleza bifuncional del enzima. En el caso concreto del isozima presente en el hígado, la fosforilación provoca la inactivación del centro activo responsable de la síntesis de la fructosa 2,6-bisfosfato y la activación del centro activo responsable de la hidrólisis de la fructosa 2,6-bisfosfato (Figura 14.24). La desfosforilación del enzima tiene efectos contrarios. En consecuencia, se ha desarrollado en las células hepáticas un mecanismo sensible para ajustar la concentración intracelular de fructosa 2,6-bisfosfato en las células hepáticas en respuesta a los cambios de los niveles sanguíneos de glucagón o adrenalina (Figura 14.25). Cuando los niveles de **glucagón** o **adrenalina** au-

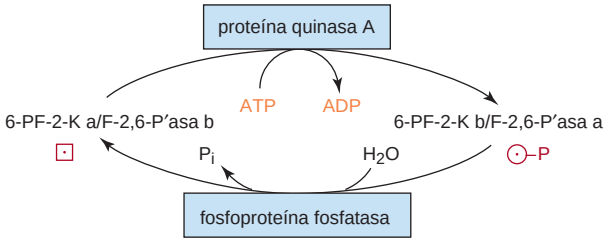


FIGURA 14.24
Mecanismo responsable de la modificación covalente del enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa.
El nombre del enzima está abreviado como 6-PF-2-K/F-2,6-P'asa. Las letras a y b indican las formas activa e inactiva, respectivamente, de cada una de las actividades enzimáticas.

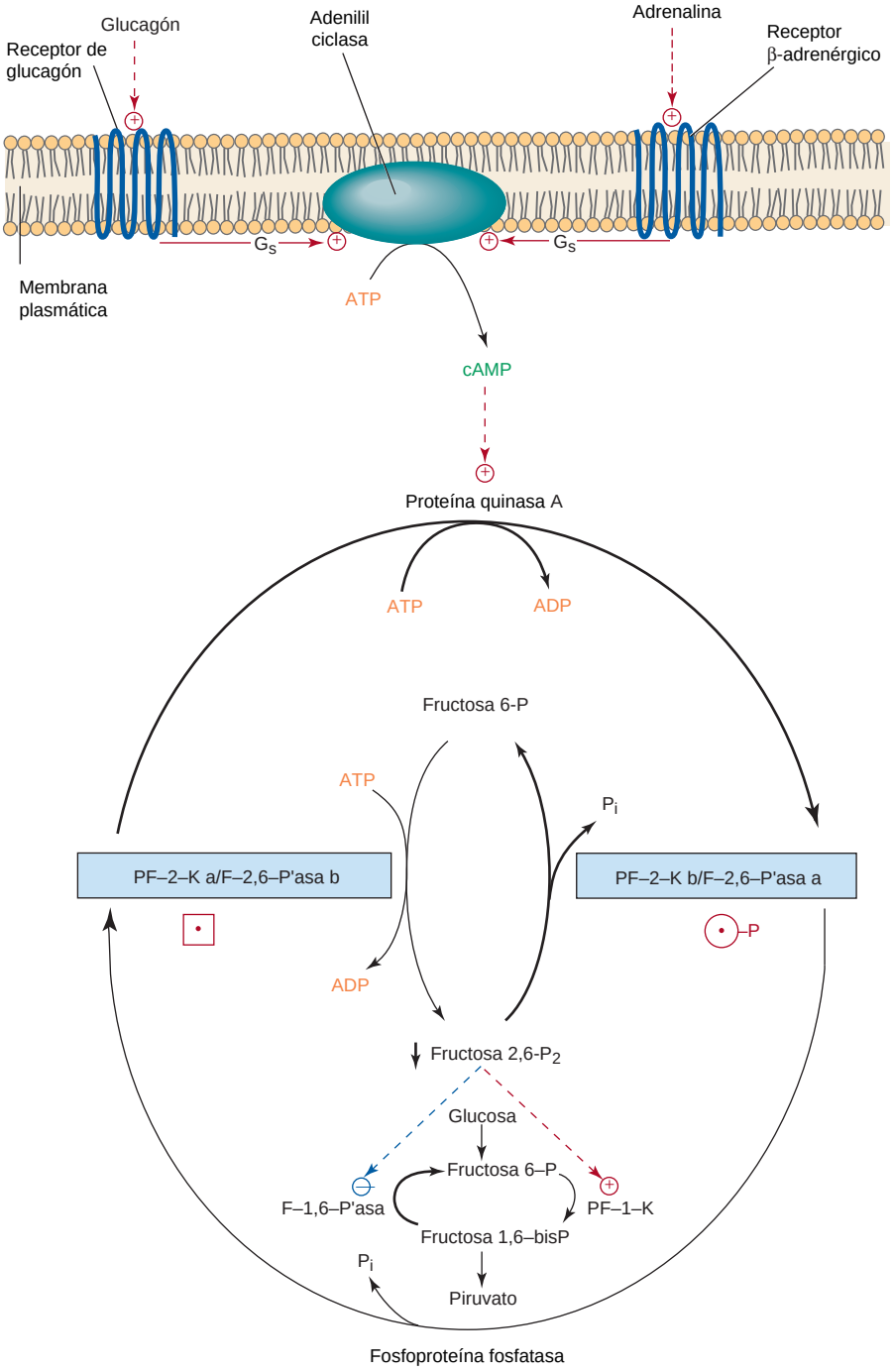


FIGURA 14.25
Mecanismo de la inhibición por glucagón y adrenalina de la glucólisis hepática, a través de la disminución en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato mediada por cAMP.
Véase el pie de la Figura 14.19. Las flechas de trazo grueso señalan aquellas reacciones que predominan en presencia de glucagón. La flecha pequeña delante de la fructosa 2,6-bisfosfato indica una disminución de la concentración de este compuesto.

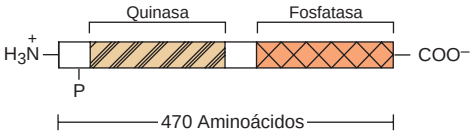


FIGURA 14.26
Diagrama esquemático de la estructura primaria del isozima hepático de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa.
H_3N^+ y COO^- designan los extremos N-terminal y C-terminal del enzima, respectivamente. El dominio con actividad quinasa está localizado en la mitad N-terminal del enzima; el dominio con actividad fosfatasa en la mitad C-terminal del enzima. La letra P indica la serina 32 fosforilada por la proteína quinasa A.

mentan, actuando a través de **los receptores de glucagón** de la membrana plasmática y de los **receptores *β*-adrenérgicos**, respectivamente, ambos inducen un incremento de los niveles intracelulares de cAMP. Este segundo mensajero activa la proteína quinasa A, la cual fosforila un único residuo de serina de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa (Figura 14.26). Esto inhibe la 6-fosforucto-2-quinasa y activa la fructosa 2,6-bisfosfatasa. La disminución resultante de la fructosa 2,6-bisfosfato disminuye la efectividad de la 6-fosfofructo-1-quinasa y aumenta la de la fructosa 1,6-bisfosfatasa. El resultado es la inhibición de la glucólisis a nivel de la conversión de la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato. Cuando los niveles de glucagón o adrenalina en sangre disminuyen, se traducen en una disminución de cAMP en el hígado, porque la adenilil ciclasa pierde actividad y el cAMP acumulado se convierte en AMP por acción de la cAMP-fosfodiesterasa. Cuando se pierde la señal de cAMP, la proteína quinasa A se inactiva y la velocidad de fosforilación de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa por la proteína quinasa A disminuye. Una **fosfoproteína fosfatasa** elimina el fosfato del enzima bifuncional, activando a la 6-fosfofructo-2-quinasa e inactivando a la fructosa 2,6-bisfosfatasa. Puede ahora acumularse fructosa 2,6-bisfosfato hasta una concentración de estado estacionario más elevada, la cual al activar a la 6-fosfofructo-1-quinasa e inactivar a la fructosa 1,6-bisfosfatasa incrementa de manera importante la glucólisis. Así pues el glucagón y la adrenalina son señales extracelulares que detienen la utilización de glucosa en el hígado, mientras que la fructosa 2,6-bisfosfato es una señal intracelular que promueve su utilización en dicho tejido.

La **insulina** tiene acciones opuestas a las del glucagón y la adrenalina a través de una cascada de señalización que empieza con la activación de la tirosina quinasa de su receptor (véase Capítulo 21). Mediante mecanismos que aún no están totalmente definidos la insulina conduce a la activación de la cAMP fosfodiesterasa (disminuye los niveles de cAMP), a la inhibición de la proteína quinasa A y a la activación de la fosfoproteína fosfatasa, todo lo cual se opone a los fectos del glucagón y de la adrenalina (Figura 14.27). La insulina actúa, por tanto, en la dirección opuesta al glucagón y la adrenalina en la determinación de los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato en las células del hígado y, en consecuencia, estimula la velocidad de la glucólisis.

El corazón contiene un isozima diferente del enzima bifuncional

Un incremento en el nivel sanguíneo de adrenalina tiene un efecto marcadamente diferente sobre la glucólisis en el **corazón** respecto al hígado. La glucólisis se inhibe en el hígado para conservar glucosa para su uso por otros tejidos. La adrenalina estimula la glucólisis en el corazón como parte de un mecanismo para satisfacer el incremento en la demanda de ATP debido a un incremento de la carga de trabajo que es señalada mediante la adrenalina. Como en el hígado, la adrenalina actúa sobre el corazón a través de un receptor β-adrenérgico en la membrana plasmática, promoviendo la formación de cAMP por la adenilil ciclasa (Figura 14.28). Esto resulta en la activación de la proteína quinasa A, que a su vez fosforila la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el hí-

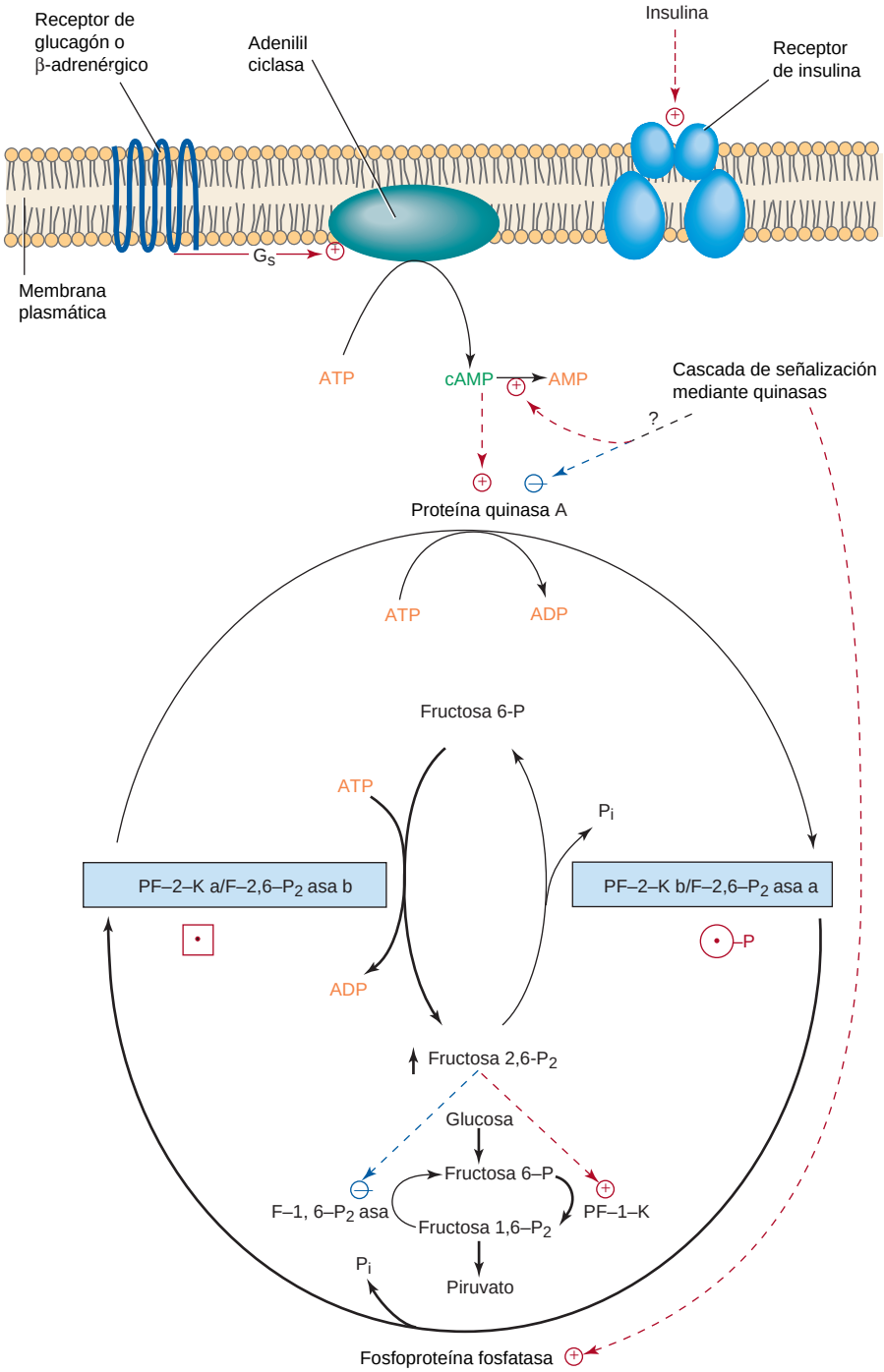


FIGURA 14.27
Mecanismo responsable del aumento de velocidad en la glucólisis hepática cuando las concentraciones de glucagón y adrenalina en la sangre son bajas y la de insulina es elevada. Veánse los pies de las Figuras 14.19 y 14.25. El receptor de la insulina es un componente intrínseco de la membrana plasmática. La flecha pequeña delante de la fructosa 2,6-bisfosfato indica un aumento de la concentración.

gado, la fosforilación del enzima bifuncional en el corazón produce un aumento en lugar de una disminución en los niveles de 2,6-bisfosfato. Esto es debido a que el corazón expresa un isozima diferente del enzima bifuncional. Aunque lleva a cabo las mismas reacciones que el enzima hepático, la secuencia de aminoácidos del isozima del corazón es diferente, y la fosforilación por la proteína quinasa A tiene lugar en un sitio que activa en lugar de inhibir la 6-fosfofructo-2-quinasa (Figura 14.29). El aumento de la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en respuesta a la adrenalina se traduce en un aumento de la actividad 6-fosfofructo-1-quinasa, y, consecuentemente, un aumento del flujo glucolítico en el corazón en respuesta a la adrenalina.

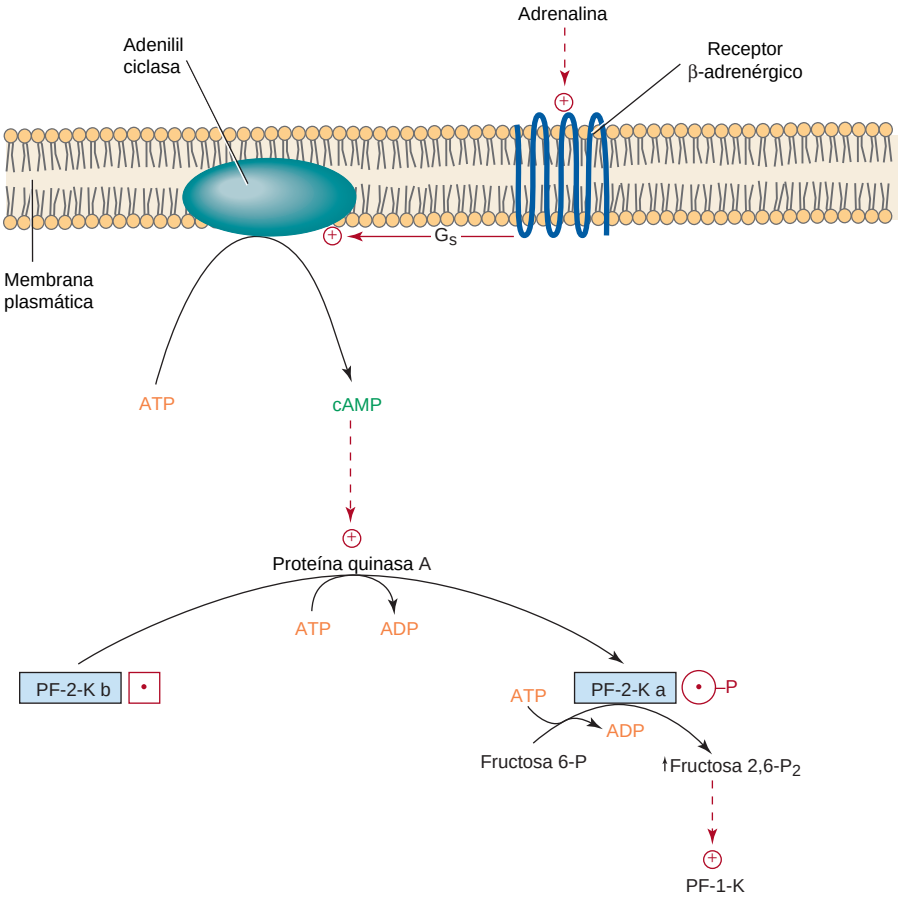


FIGURA 14.28
Mecanismo responsable del aumento de velocidad de la glucólisis en el corazón en respuesta a la adrenalina.
Veánse los pies de las figuras 14.19 y 14.27.

La piruvato quinasa es un enzima de la glucólisis sujeto a regulación

La **piruvato quinasa** es otro enzima regulador de la glucólisis (véase Apli. Clín. 14.8). Este enzima es inhibido drásticamente por concentraciones fisiológicas de ATP, de tal manera que probablemente nunca se alcanza plenamente su actividad potencial en condiciones fisiológicas. El isozima que se encuentra en el hígado es activado fuertemente por la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP), uniendo así la regulación de la piruvato quinasa con lo que sucede a nivel de la 6-fosfofructo-1-quinasa. Así, si las condiciones favorecen un flujo mayor a través de la 6-fosfofructo-1-quinasa, aumenta el nivel de FBP, que actúa produciendo activación por precursor de la piruvato quinasa. El enzima hepático también está también sujeto a modificación covalente por la proteína quinasa A, y es activo en el estado desfosforilado e inactivo en el estado fosforilado (Figura 14.30). La inhibición concurrente de la glucólisis hepática y la estimulación de la gluconeogénesis hepática por el glucagón se explican,

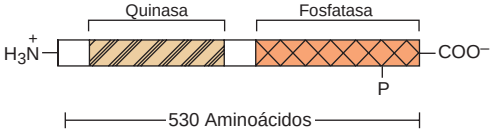
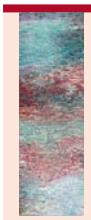


FIGURA 14.29
Diagrama esquemático de la estructura primaria del isozima de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa presente en el corazón.
Veáse el pie de la Figura 14.26. La letra P indica el sitio (serina 466) fosforilado por la proteína quinasa A.



APLICACIÓN CLÍNICA 14.8
Anemia hemolítica por déficit de piruvato quinasa

La producción de ATP en los eritrocitos maduros depende absolutamente de la actividad glucolítica. El ATP es necesario para las bombas iónicas, en especial la Na^+, K^+–ATPasa, que mantienen la forma de disco bicóncavo de los eritrocitos, una característica que les ayuda a deslizarse a través de los capilares cuando llevan el oxígeno a los tejidos. Sin ATP, las células se hinchan y se rompen. La anemia debida a la destrucción excesiva de los eritrocitos se conoce como anemia hemolítica. El déficit de piruvato quinasa es raro, pero es con mucho el defecto genético más común de la vía glucolítica causante de anemia hemolítica. La mayor parte de los pacientes con déficit de piruvato quinasa tienen entre un 5 y un 25% de los niveles de piruvato quinasa de los eritrocitos normales, y el flujo a través de la vía glucolítica está severamente restringido, lo que se traduce en niveles de ATP marcadamente inferiores. Se observa el previsible entrecruzamiento de los intermedios de la vía glucolítica, esto es, los intermedios anteriores al paso catalizado por la piruvato quinasa se acumulan, mientras que las concentraciones de lactato y piruvato disminuyen. En los reticulocitos de pacientes con esta enfermedad se observan niveles normales de ATP. Aunque estos hematíes "inmaduros" son deficitarios en piruvato quinasa, contienen mitocondrias, y pueden generar ATP por fosforilación oxidativa. La maduración de los reticulocitos a hematíes comporta la pérdida de mitocondrias, con lo que aparece una dependencia completa de la glucólisis para la producción de ATP. Como la glucólisis es defectuosa, las células maduras se pierden rápidamente de la circulación. La anemia aparece porque las células no pueden ser reemplazadas de forma suficientemente rápida por la eritropoyesis.

Valentine, W. N. The Stratton lecture: hemolytic anemia and inborn errors of metabolism. *Blood* 54:549, 1979; y Tanaka, K. R. y Paglia, D. E. Pyruvate kinase and other enzymopathies of the erythrocyte. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 3485.

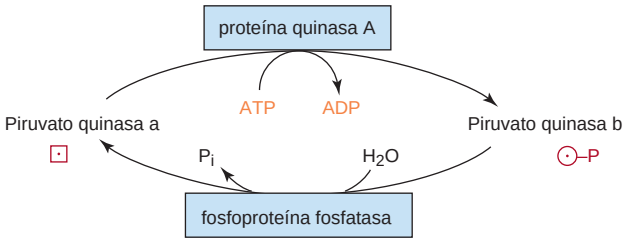


FIGURA 14.30
El glucagón actúa a través del cAMP provocando la fosforilación e inactivación de la piruvato quinasa hepática.

en parte, por la inhibición de la piruvato quinasa producida por la activación de la proteína quinasa A por el cAMP. Esta cuestión se explora más extensamente en la Sección 14.5 (véase p. 641) donde se discute la gluconeogénesis.

La piruvato quinasa, al igual que la glucoquinasa, se induce en el hígado a concentraciones de estado estacionario elevadas por la combinación de gran ingestión de glúcidos y altos niveles de insulina. Este aumento en la concentración de enzima es una de las principales causas de que el hígado de un individuo bien nutrido tenga una mayor capacidad para utilizar glúcidos que el de una persona que ayuna o es diabética (véase Apli. Clín. 14.4).

14.5 | GLUCONEOGÉNESIS

La síntesis de glucosa es necesaria para la supervivencia

La síntesis neta o formación de glucosa a partir de sustratos no glucídicos se denomina **gluconeogénesis**. Ésta incluye la utilización de varios aminoácidos, lactato, piruvato, propionato y glicerol como fuentes de carbono para la vía (Figura 14.31). La glucosa también se sintetiza a partir de la galactosa y fructosa. La **glucogenólisis**, esto es, la formación de glucosa o de glucosa 6-fosfato a partir del glucógeno, debe diferenciarse de la gluconeogénesis; la glucogenólisis se refiere a

$$\text{Glucógeno o } (\text{glucosa})_n \rightarrow n \text{ moléculas de glucosa}$$

y, por tanto, no corresponde a la síntesis neta o *de novo* de glucosa, que es la característica principal de la gluconeogénesis.

La capacidad de síntesis de glucosa es crucial para la supervivencia del hombre y otros animales. Se han de mantener los niveles de glucosa sanguínea para permitir el metabolismo de aquellos tejidos que utilizan glucosa como sustrato primario (véase Apli. Clín. 14.9). Entre ellos se cuentan el cerebro, hematíes, médula renal, cristalino y córnea del ojo, testículos y otros tejidos. La gluconeogénesis permite el mantenimiento de los niveles de glucosa sanguíneos bastante tiempo después de que toda la glucosa de la dieta se haya absorbido y oxidado completamente.

Ciclos de Cori y de la alanina

Se sabe que existen dos ciclos importantes entre tejidos en los que interviene la gluconeogénesis. Los **ciclos de Cori** y **de la alanina** (Figura 14.32) dependen de la gluconeogénesis en el hígado, seguida por la distribución de glucosa y su uso en

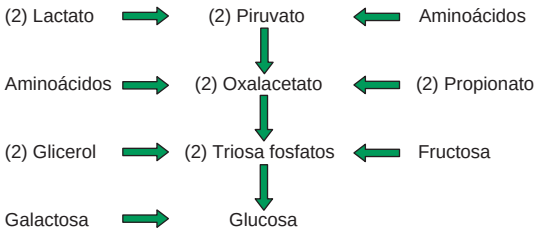
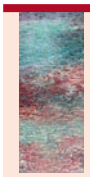


FIGURA 14.31
Ruta abreviada de la gluconeogénesis, en la que se ilustran los principales sustratos precursores del proceso.

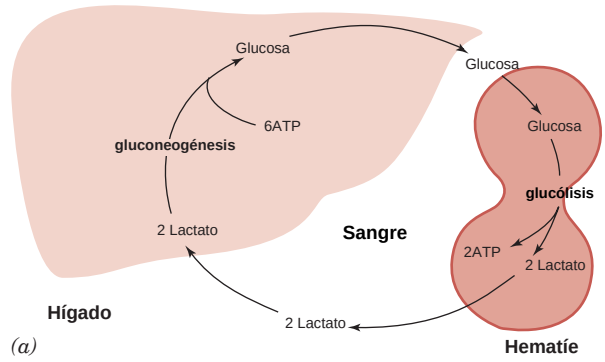


APLICACIÓN CLÍNICA 14.9
Hipoglucemia y niños prematuros

Los neonatos prematuros y los que son pequeños respecto a su edad gestacional presentan una mayor susceptibilidad a la hipoglucemia que los niños de embarazo completo y normales según la edad gestacional. Diversos factores parecen estar implicados en ello. Los niños, en general, son más susceptibles que los adultos a la hipoglucemia, simplemente porque tienen una proporción mayor de cerebro con respecto al peso corporal, y el cerebro utiliza cantidades de glucosa desproporcionadamente mayores que el resto del cuerpo. Los recién nacidos tienen una capacidad limitada de cetogénesis, debido aparentemente a que está poco desarrollado en ellos el transporte de ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias hepáticas. Dado que la utilización de cuerpos cetónicos por el cerebro es directamente proporcional a la concentración de cuerpos cetónicos circulantes, el recién nacido no puede ahorrar glucosa en cantidad significativa mediante el uso de cuerpos cetónicos. La consecuencia de ello es que el cerebro del recién nacido depende casi completamente de la glucosa obtenida por la glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas.

La capacidad de síntesis de glucosa hepática a partir del lactato y de la alanina está también limitada en los recién nacidos. Esto se debe a que el enzima limitante de velocidad, la fosfo*enol*piruvato carboxiquinasa, está presente en concentraciones muy bajas durante las primeras horas que siguen al alumbramiento. La inducción del enzima a los niveles requeridos para evitar la hipoglucemia durante el estrés del ayuno requiere varias horas. Se cree que los recién nacidos prematuros o pequeños con respecto a la edad gestacional son más susceptibles a la hipoglucemia que los recién nacidos normales, debido a que los depósitos de glucógeno hepático son en los primeros más pequeños. El ayuno elimina los depósitos de glucógeno más rápidamente, haciendo que los recién nacidos prematuros dependan más de la gluconeogénesis que los recién nacidos normales.

Ballard, F. J. The development of gluconeogenesis in rat liver: controlling factors in the newborn. *Biochem. J.* 124:265, 1971; y Newsholme, E. A. y Leech, A. R. *Biochemistry for the Medical Sciences.* New York: Wiley, 1983.



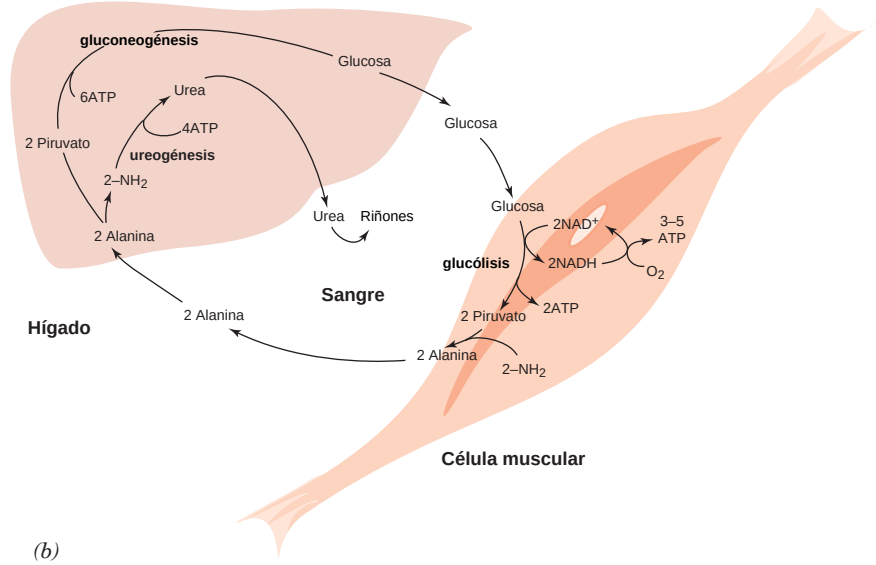


FIGURA 14.32
Relación entre gluconeogénesis en el hígado y glucólisis en el resto del cuerpo.
(*a*) Ciclo de Cori. (*b*) Ciclo de la alanina.

un tejido periférico. En ambos ciclos, se proporciona un mecanismo para el suministro de glucosa de forma continua a tejidos que dependen de ella como fuente primaria de energía. Estos ciclos son funcionales solamente entre el hígado y tejidos que no oxidan completamente la glucosa a CO_2 y H_2O. Con el fin de participar en estos ciclos, los tejidos periféricos deben liberar alanina o lactato como producto final del metabolismo de la glucosa. La diferencia principal en el ciclo de Cori (Figura 14.32*a*) y el ciclo de la alanina (Figura 14.32*b*) es que en el ciclo de Cori, el carbono vuelve al hígado en forma de lactato, y en el ciclo de la alanina, lo hace en forma de alanina. Otra diferencia es que el NADH generado por la glucólisis no es, en el ciclo de la alanina, utilizado para reducir el piruvato a lactato ya que de no ser así no habría piruvato disponible para su conversión en alanina por transaminación con glutamato. En los tejidos que contienen mitocondrias, los electrones del NADH pueden ser transportados a la mitocondria mediante la lanzadera del malato–aspartato, o mediante la lanzadera del glicerol fosfato para la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}\,O_2 + 2\tfrac{1}{2}\,ADP + 2\tfrac{1}{2}\,P_i \rightarrow NAD^+ + 2\tfrac{1}{2}\,ATP$$

o

$$FADH_2 + \tfrac{1}{2}\,O_2 + 1\tfrac{1}{2}\,ADP + 1\tfrac{1}{2}\,P_i \rightarrow FAD + 1\tfrac{1}{2}\,ATP$$

La consecuencia de ello es que se pueden formar de cinco a siete moléculas de ATP por molécula de glucosa en los tejidos periféricos que participan en el ciclo de la alanina. Ello contrasta con el ciclo de Cori en el que sólo se producen dos moléculas de ATP por molécula de glucosa. La estequiometría global del ciclo de Cori es

$$6\ ATP_{hígado} + 2\ (ADP + P_i)_{hematíes} \rightarrow 6\ (ADP + P_i)_{hígado} + 2\ ATP_{hematíes}$$

Seis moléculas de ATP son necesarias en el hígado para suministrar la energía necesaria para la síntesis de glucosa. El ciclo de la alanina también transfiere la energía desde el hígado a los tejidos periféricos y, gracias a las cinco a siete moléculas de ATP producidas por molécula de glucosa, es un ciclo energéticamente más eficiente. No obstante, la participación de alanina en el ciclo introduce en el hígado nitrógeno amínico que debe ser eliminado en forma de urea (Figura 14.32*b* y p. 787). La síntesis de urea es cara puesto que consume 4 moléculas de ATP por cada molécula de urea producida en el ciclo de la urea. Esta necesidad de síntesis de urea hace que la cantidad de ATP requerida por molécula de glucosa aumente a 10 moléculas por molécula de glucosa durante el ciclo de la alanina:

$$10\ ATP_{hígado} + 5\text{–}7\ (ADP + P_i)_{músculo} + O_{2\ músculo} \rightarrow 10\ (ADP + P_i)_{hígado} + 5\text{–}7\ ATP_{músculo}$$

Esto junto con la necesidad de oxígeno y mitocondrias en el tejido periférico para su participación en el ciclo de la alanina lo distinguen del ciclo de Cori

Síntesis de la glucosa a partir del lactato

La gluconeogénesis a partir de lactato es un proceso que requiere ATP, con la ecuación global

$$2\ \text{L-lactato}^- + 6\ ATP^{4-} + 6\ H_2O \rightarrow \text{glucosa} + 6\ ADP^{3-} + 6\ P_i^{2-} + 4\ H^+$$

Muchos enzimas de la vía glucolítica son comunes a la vía gluconeogénica. Puesto que la glucólisis produce 2 ATP y la gluconeogénesis requiere 6 ATP por molécula de glucosa, deben estar implicadas reacciones adicionales. Además, ciertos pasos de la vía glucolítica son irreversibles en las condiciones intracelulares y son reemplazados por reacciones irreversibles de la vía gluconeogénica. En la Figura 14.33 se presentan las reacciones de la gluconeogénesis a partir de lactato. El paso inicial es la conversión de lactato a piruvato por la lactato deshidrogenasa, reacción en la que se genera NADH, que es utilizado en un paso posterior. El piruvato no se puede convertir en fosfo*enol*piruvato (PEP) por la piruvato quinasa, debido a que la reacción es irreversible en las condiciones intracelulares. El piruvato se convierte en el compuesto de alto contenido energético PEP acoplando dos reacciones que requieren compuestos con fosfato de alta energía (un ATP y un GTP). La primera está catalizada por la **piruvato carboxilasa** y la segunda por la **PEP carboxiquinasa** (véase Figura 14.34). El **GTP**, requerido por la PEP carboxiquinasa, es equivalente a un ATP a través de la acción de la nucleósido difosfato quinasa ($GDP + ATP \rightleftharpoons GTP + ADP$). El CO_2 generado por la PEP carboxiquinasa y el HCO_3^- requerido por la piruvato carboxilasa se equilibran rápidamente por acción de la **carbónico anhidrasa** ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$). Así, sumando estas reacciones con las reacciones de la Figura 14.34 da

$$\text{Piruvato}^- + 2\ ATP^{4-} \rightarrow \text{fosfo}\textit{enol}\text{piruvato}^{3-} + 2\ ADP^{3-} + 2\ P_i^{2-} + 2\ H^+$$

De esta manera, la conversión de piruvato en PEP durante la gluconeogénesis le cuesta a la célula 2 moléculas de ATP, mientras que la conversión del PEP en piruvato durante la glucólisis proporciona a la célula sólo una molécula de ATP.

La localización intracelular de la piruvato carboxilasa hace que las mitocondrias sean imprescindibles para la conversión de piruvato citosólico en PEP citosólico (Figura 14.33). El oxalacetato puede transformarse a continuación en glucosa si-

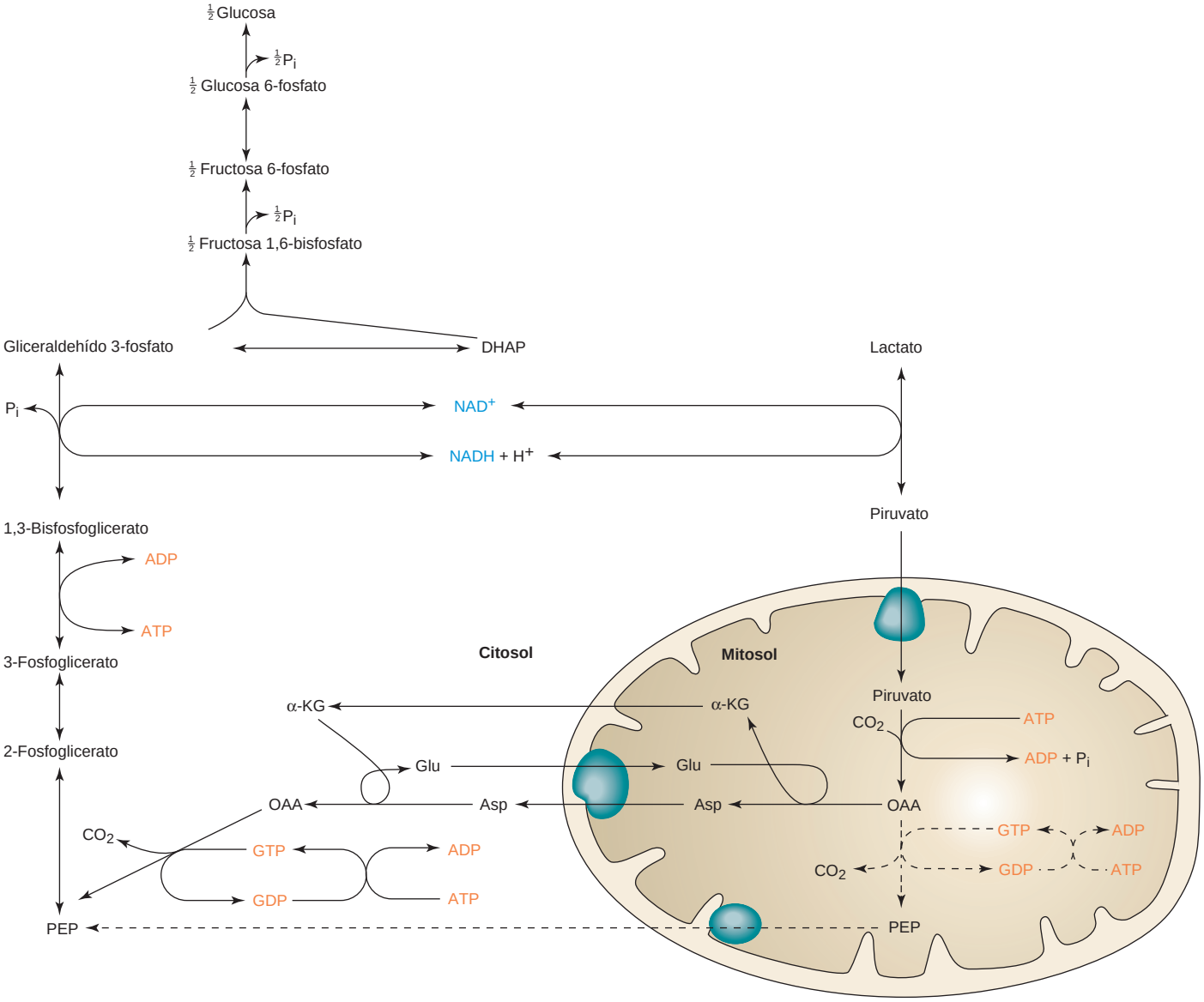


FIGURA 14.33
Ruta de la gluconeogénesis a partir del lactato.
En la figura se indica la implicación de la mitocondria en el proceso. Las flechas a trazos se refieren a una ruta alternativa que utiliza PEP carboxiquinasa mitosólica en lugar del isozima citosólico. Abreviaturas: OAA, oxalacetato; ***α***-KG, ***α***-cetoglutarato; PEP, fosfo*enol*piruvato; y DHAP, dihidroxiacetona fosfato.

guiendo dos rutas. Esto sucede porque la PEP carboxiquinasa se encuentra tanto en el compartimiento citosólico como en el mitosólico. En la ruta en la que interviene la PEP carboxiquinasa mitocondrial el oxalacetato se convierte dentro de la mitocondria en PEP, el cual atraviesa seguidamente la membrana mitocondrial interna. La segunda ruta sería igual de simple si el oxalacetato pudiese atravesar la membrana mitocondrial interna. Sin embargo, el oxalacetato no puede ser transportado fuera de la mitocondria por falta de un transportador (Figura 14.10*b*). Por tanto, se convierte el oxalacetato en aspartato, el cual es transportado al exterior mediante el **sistema de cotransporte antiparalelo aspartato–glutamato**. En el citosol, el aspartato se transamina con α-cetoglutarato produciendo oxalacetato el cual es utilizado por la PEP carboxiquinasa citosólica para la síntesis de PEP.

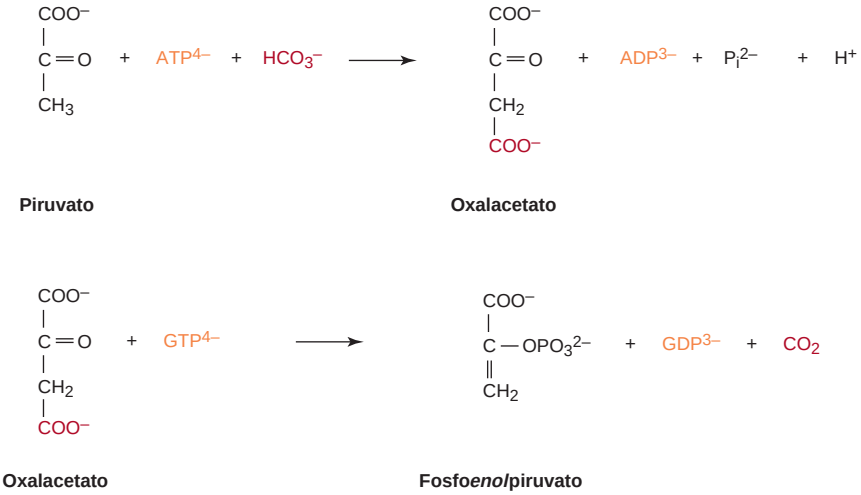


FIGURA 14.34
Pasos implicados en la formación de fosfo*enol*piruvato a partir de piruvato que requieren energía.
Las reacciones son catalizadas respectivamente por la piruvato carboxilasa y la PEP carboxiquinasa.

La gluconeogénesis utiliza muchos de los enzimas glucolíticos, pero en dirección inversa

Los enzimas de la vía glucolítica actúan en dirección inversa para convertir el PEP en fructosa 1,6-bisfosfato durante la gluconeogénesis. El NADH generado por la lactato deshidrogenasa es utilizado por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, estableciendo un equilibrio exacto en la generación y utilización de equivalentes de reducción.

La 6-fosfofructo-1-quinasa cataliza un paso irreversible en la ruta glucolítica, por lo que no puede utilizarse para la conversión de la FBP en fructosa 6-fosfato. Una forma de sortear este problema es utilizar el enzima **fructosa-1,6-bisfosfatasa**, que cataliza la hidrólisis irreversible de la fructosa 1,6-bisfosfato (Figura 14.35).

La reacción catalizada por la **fosfoglucoisomerasa** es fácilmente reversible y funciona tanto en la ruta glucolítica como en la gluconeogénica. La **glucosa 6-fosfatasa**, que es utilizada en lugar de la glucoquinasa para el último paso de la gluconeogénesis, cataliza una reacción de hidrólisis irreversible en las condiciones intracelulares (Figura 14.36). En esta reacción, los nucleótidos no desempeñan ningún papel; la función de este enzima es generar glucosa, y no convertir glucosa en glucosa 6-fosfato. La glucosa 6-fosfatasa es un enzima ligado a la membrana del retículo endoplasmático, y tiene su centro activo disponible para la hidrólisis de G6P situado en la superficie de la cisterna de los túbulos (Figura 14.37). La G6P necesita una translocasa para poder desplazarse desde el citosol hasta su sitio de hidrólisis en el interior del retículo endoplasmático. Un defecto genético en las traslocasa o en la fosfatasa interfiere con la gluconeogénesis y provoca una acumulación masiva de glucógeno en el hígado.

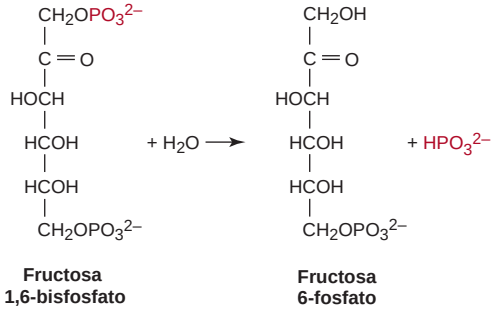


FIGURA 14.35
Reacción catalizada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa.

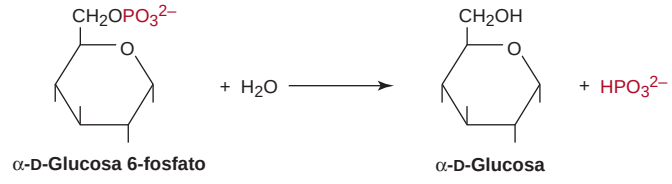


FIGURA 14.36
Reacción catalizada por la glucosa 6-fosfatasa.

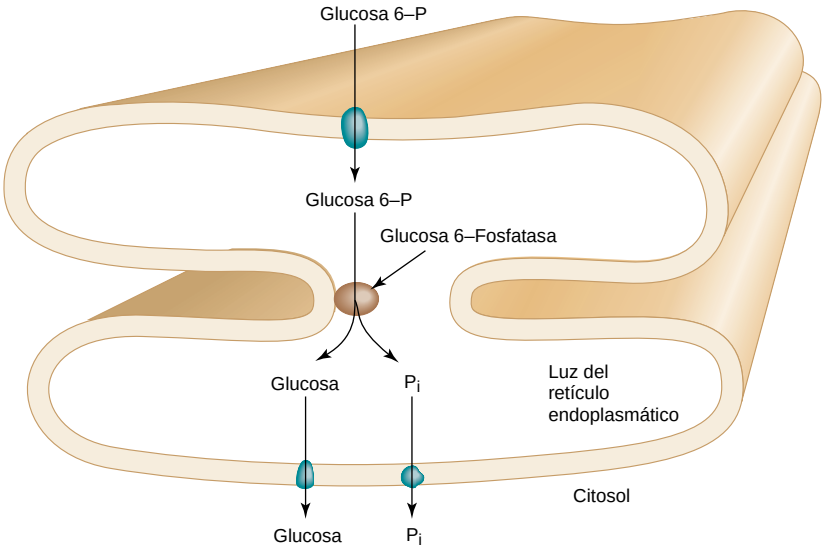


FIGURA 14.37
La glucosa 6-fosfatasa, localizada en la superficie interna del retículo endoplasmático, hidroliza a la glucosa 6-fosfato.
En el proceso intervienen tres transportadores: uno introduce a la glucosa 6-fosfato en la luz, otro devuelve el P_i al citosol y el tercero vuelve a llevar la glucosa al citosol.

La glucosa se sintetiza a partir de la cadena carbonada de algunos aminoácidos

Todos los aminoácidos, excepto la **leucina** y la **lisina**, pueden suministrar carbono para la síntesis neta de glucosa por la gluconeogénesis. Si el catabolismo de un aminoácido puede dar lugar a la formación de piruvato u oxalacetato, entonces también puede tener lugar la síntesis neta de glucosa a partir de aquel aminoácido. El oxalacetato es un intermediario de la gluconeogénesis, y el piruvato se convierte fácilmente en oxalacetato por acción de la piruvato carboxilasa (Figura 14.33). La ruta abreviada, presentada en la Figuta 14.31, ilustra la manera en que el catabolismo de los aminoácidos se acopla con el proceso de la gluconeogénesis. El catabolismo de los aminoácidos suministra carbono al ciclo de los ácidos tricarboxílicos en más de un punto. Siempre que haya síntesis neta de un intermediario del ciclo TCA como consecuencia del catabolismo de un aminoácido determinado, se producirá entonces síntesis neta de oxalacetato. Las reacciones que conducen a la síntesis neta de intermediarios del ciclo TCA, se denominan **reacciones anapleróticas (anaplerosis)** y mantienen la gluconeogénesis al proporcionar las condiciones necesarias para la síntesis neta de oxalacetato. Las reacciones catalizadas por la piruvato carboxilasa y por la glutamato deshidrogenasa constituyen buenos ejemplos de reacciones anapleróticas:

$$\text{Piruvato}^- + \text{ATP}^{4-} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{oxalacetato}^{2-} + \text{ADP}^{3-} + \text{P}_i^{2-} + \text{H}^+$$

$$\text{Glutamato}^- + \text{NAD(P)}^+ \rightarrow \alpha\text{-cetoglutarato}^{2-} + \text{NAD(P)H} + \text{NH}_4^+ + \text{H}^+$$

Por otro lado, la reacción catalizada por la glutamato–oxalacetato transaminasa (α-cetoglutarato + aspartato → glutamato + oxalacetato) no es una reacción anaplerótica, debido a que no se consigue síntesis neta de un intermediario del ciclo TCA; esto es, la formación de un intermediario del ciclo TCA (oxalacetato) a partir del aspartato está compensada por la conversión de un intermediario del cico ciclo TCA (α-cetoglutarato) en glutamato.

Como la gluconeogénesis a partir de aminoácidos impone una carga de nitrógeno sobre el hígado, existe una relación estrecha entre la síntesis de urea y la síntesis de glucosa a partir de aminoácidos. Esta relación se ilustra en la Figura 14.38 para la alanina. Se observa que se metabolizan dos moléculas de alanina, dando una de ellas NH_4^+, y la otra aspartato, los sustratos primarios del ciclo de la urea. El aspartato abandona la mitocondria y forma parte del ciclo de la urea, después de haber reaccionado con la citrulina. El carbono del aspartato es liberado del ciclo de

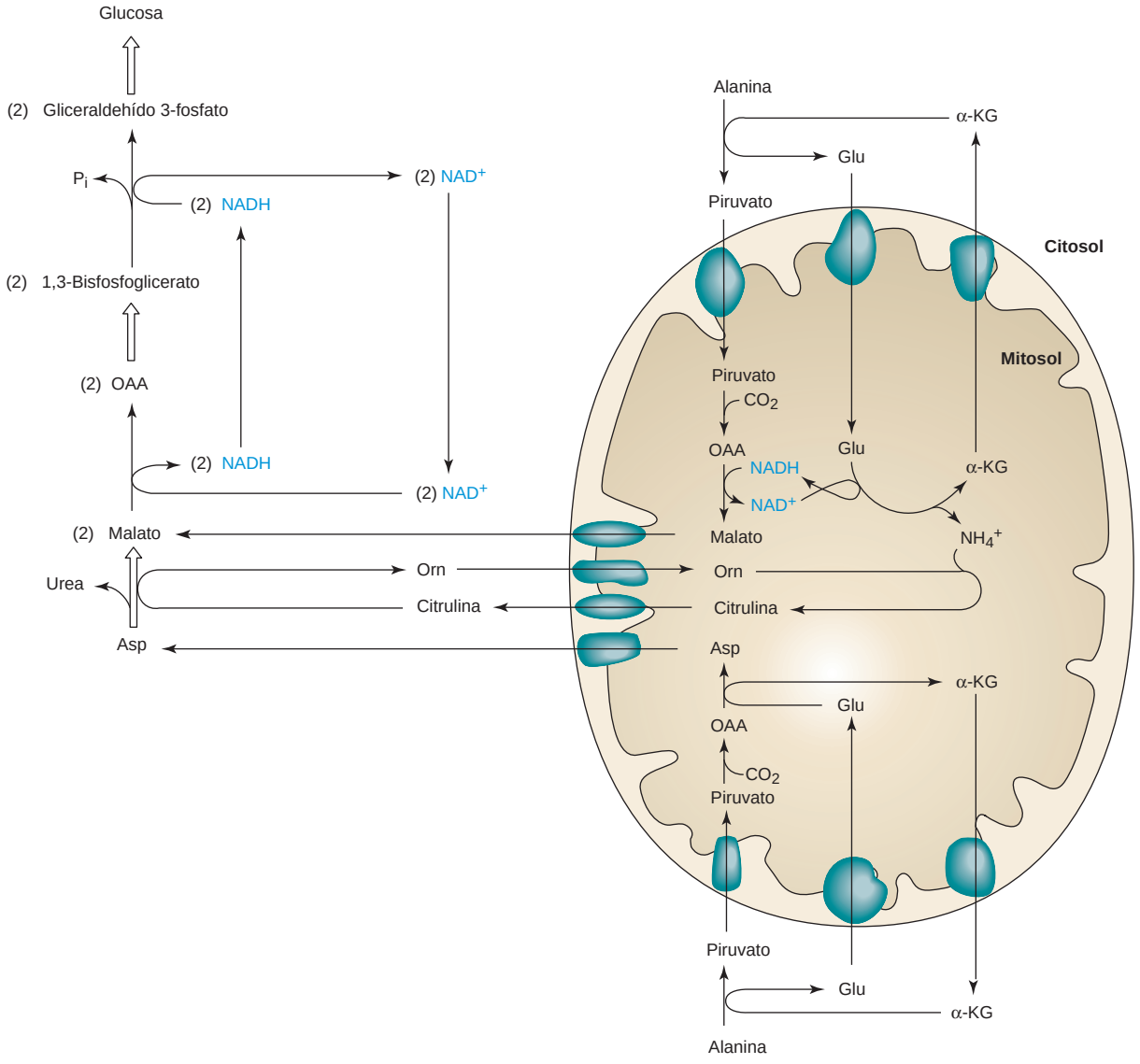


FIGURA 14.38
Ruta de la gluconeogénesis a partir de la alanina y su relación con la síntesis de urea.

la urea en forma de fumarato, el cual se convierte a su vez en malato por acción de la fumarasa citosólica. Tanto este malato como el malato ya existente en la mitocondria se convierten en glucosa por acción de los enzimas citosólicos de la ruta gluconeogénica. Se consigue un equilibrio entre los equivalentes de reducción (NADH) generados y los requeridos, tanto en el espacio citosólico como en el mitosólico. La suma de las reacciones de la Figura 14.38 dan simplemente

$$2 \text{ alanina} + 10 \text{ ATP} + CO_2 \rightarrow \text{glucosa} + \text{urea} + 10 \text{ ADP} + 10 \text{ } P_i$$

La **leucina** y la **lisina** son los únicos aminoácidos que no pueden actuar como fuente de carbono para la síntesis neta de glucosa. Éstos son **cetogénicos**, pero no **glucogénicos**. Tal como se muestra en la Tabla 14.2, los restantes aminoácidos se clasifican como glucogénicos o, como mínimo, como glucogénicos y cetogénicos simultáneamente. Los **aminoácidos glucogénicos** dan lugar a la síntesis neta, bien de piruvato, bien de oxalacetato, mientras que los aminoácidos que son a la vez glucogénicos y cetogénicos también producen el cuerpo cetónico acetoacetato, o acetil CoA, que es fácilmente convertible en cuerpos cetónicos. El acetil CoA es el producto final del metabolismo de la lisina, y el acetoacetato, y el acetil CoA son los productos finales del metabolismo de la leucina. En el hombre y en otros animales, no existe ninguna ruta que convierta el acetoacetato o el acetil CoA en piruvato u oxalacetato. El acetil CoA

TABLA 14.1 Aminoácidos glucogénicos y cetogénicos

Glucogénicos	*Cetogénicos*	*Ambos*
Glicina	Leucina	Treonina
Serina	Lisina	Isoleucina
Valina		Fenilalanina
Histidina		Tirosina
Arginina		Triptófano
Cisteína		
Prolina		
Hidroxiprolina		
Alanina		
Glutamato		
Glutamina		
Aspartato		
Asparagina		
Metionina		

no se puede utilizar para la síntesis neta de glucosa, puesto que la reacción catalizada por el complejo de la **piruvato deshidrogenasa** es irreversible:

$$\text{Piruvato} + \text{NAD}^+ + \text{CoASH} \rightarrow \text{acetil CoA} + \text{NADH} + \text{CO}_2$$

Podría argumentarse que el oxalacetato se genera a partir del acetil CoA vía ciclo TCA:

$$\text{Acetil CoA} \rightarrow \text{citrato} \rightarrow \rightarrow 2\ \text{CO}_2 + \text{oxalacetato}$$

Sin embargo, éste es un falso argumento, ya que omite el requerimiento del oxalacetato en la formación del citrato a partir del acetil CoA mediante la citrato sintasa:

$$\text{Acetil CoA} + \text{oxalacetato} \rightarrow \text{citrato} + \text{CoA}$$

La descarboxilación del citrato por el ciclo TCA regenera el oxalacetato

$$\text{Citrato} \rightarrow \rightarrow 2\ \text{CO}_2 + \text{oxalacetato}$$

Ls suma de estas reacciones da la reacción suma de una vuelta del ciclo TCA:

$$\text{Acetil CoA} \rightarrow 2\ \text{CO}_2 + \text{CoA}$$

De este modo no hay síntesis neta de un intermediario del ciclo TCA durante la oxidación completa del acetil CoA. La síntesis de glucosa a partir de acetil CoA es imposible para los animales.

La glucosa se puede sintetizar a partir de ácidos grasos de cadena impar

La ausencia de una vía anaplerótica a partir del acetil CoA significa que, en general, es imposible sintetizar glucosa a partir de ácidos grasos. La mayor parte de los ácidos grasos que se encuentran en el cuerpo humano son de cadena lineal con un número par de átomos de carbono. Su catabolismo por la oxidación de ácidos grasos, seguida de cetogénesis u oxidación completa a CO_2 puede ser abreviada, tal como se muestra en la Figura 14.39. Dado que el acetil CoA y otros intermediarios de la oxidación de ácidos grasos de cadena par no pueden convertirse en oxalacetato o cualquier otro intermediario de la gluconeogénsis, es imposible sintetizar glucosa a partir de ácidos grasos. Una excepción a esta regla general la constituyen los ácidos grasos con **ramificaciones de grupos metilo** (p. ej., **ácido fitánico**, obtenido como producto de degradación de la clorofila; véase la exposición de la **enfermedad de Refsum**, Apli. Clín. 16.6) y los ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono. El catabolismo de tales compuestos conduce a **propionil CoA**:

Ácido graso de número (n) impar de átomos de carbono →

$$\frac{(n-3)}{2}\ \text{acetil CoA} + 1\ \text{propionil CoA}$$

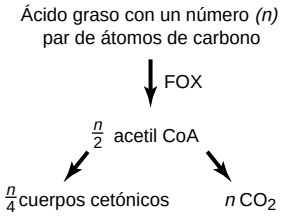


FIGURA 14.39
Esquema del catabolismo de los ácidos grasos a cuerpos cetónicos y CO_2.

El **propionato** es un buen precursor para la gluconeogénesis, pues genera oxalacetato por **la vía anaplerótica** mostrada en la Figura 14.40. El éster de coenzima A con el propionato también se produce en el catabolismo de valina e isoleucina y en la conversión del colesterol en ácidos biliares.

A veces se afirma de forma poco precisa que el hígado *no puede* transformar la grasa en glúcido (glucosa). Esto es cierto para el catabolismo de los ácidos grasos con un número par de átomos de carbono. Sin embargo, el término "grasa" se utiliza corrientemente para referirse a los triacilgliceroles, que están compuestos por tres grupos *O*-acilo combinados con una molécula de glicerol. La hidrólisis de un triacilglicerol proporciona tres ácidos grasos y glicerol, siendo este último compuesto un sustrato excelente para la gluconeogénesis (Figura 14.41). La fosforilación del glicerol por la glicerol quinasa produce glicerol 3-fosfato, el cual puede ser convertido, por acción de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, en dihidroxiacetona fosfato, que es un intermediario de la ruta gluconeogénica (véase Figura 14.33). La última fase de la glucólisis puede competir con la vía gluconeogénica, convirtiendo la dihidroxiacetona fosfato en lactato (o en piruvato para su posterior oxidación completa a CO_2 y H_2O).

La glucosa se sintetiza a partir de otros azúcares

Fructosa

El hombre consume cantidades considerables de **fructosa** en forma de **sacarosa** la cual da lugar a glucosa y fructosa al ser hidrolizada por la sacarasa en el intestino delgado. En el hígado, la fructosa se fosforila mediante una quinasa especial ligada a ATP (Figura 14.42) dando **fructosa 1-fosfato** (véase Apli. Clín. 14.3). A continuación, una aldolasa especial escinde la fructosa 1-fosfato, lo que da una molécula de dihidroxiacetona fosfato y una de gliceraldehído. Este último compuesto es reducido probablemente a glicerol y utilizado por la misma vía indicada en la figura anterior. Las dos moléculas de dihidroxiacetona fosfato que se obtienen a partir de una molécula de fructosa pueden ser convertidas en glucosa por enzimas de la ruta gluconeogénica o, alternativamente, en piruvato o lactato por la última fase de la glucólisis. Por analogía con la glucólisis, la conversión de fructosa en lactato se denomina **fructólisis**.

La principal fuente de energía de los **espermatozoides** es la fructosa, formada a partir de la glucosa por células de la vesícula seminal, según la vía mostrada en la Figura 14.43. A una reducción de la glucosa, dependiente de NADPH, le sigue una oxidación dependiente de NAD^+ del sorbitol a fructosa. La fructosa se secreta de las vesículas seminales en un fluido que pasa a formar parte del semen. Aunque la concentración de fructosa en el semen humano puede ser superior a 10 mM, los

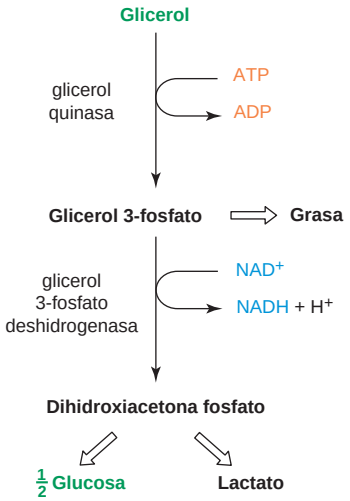


FIGURA 14.41
Vía de la gluconeogénesis a partir del glicerol junto con las vías competidoras. Las flechas grandes indican los pasos de las rutas glucolítica y gluconeogénica que se han detallado en las Figuras 14.6 y 14.33, respectivamente. La flecha grande que apunta hacia la grasa se refiere a la síntesis de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos.

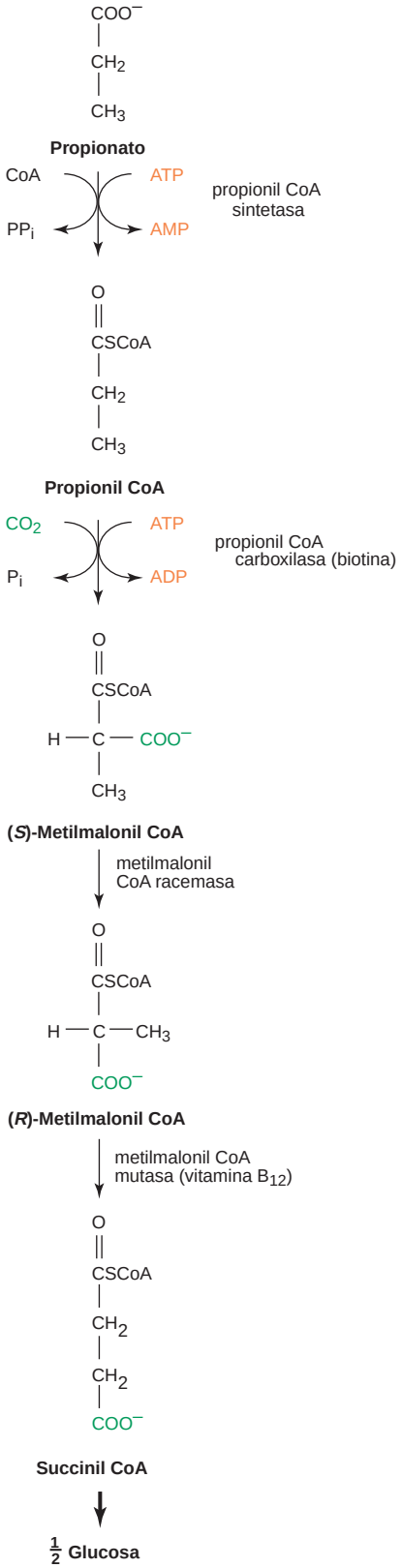


FIGURA 14.40
Ruta de la gluconeogénesis a partir del propionato. La flecha gruesa se refiere a los pasos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y a los pasos de la gluconeogénesis a partir de lactato (véase Figura 14.33).

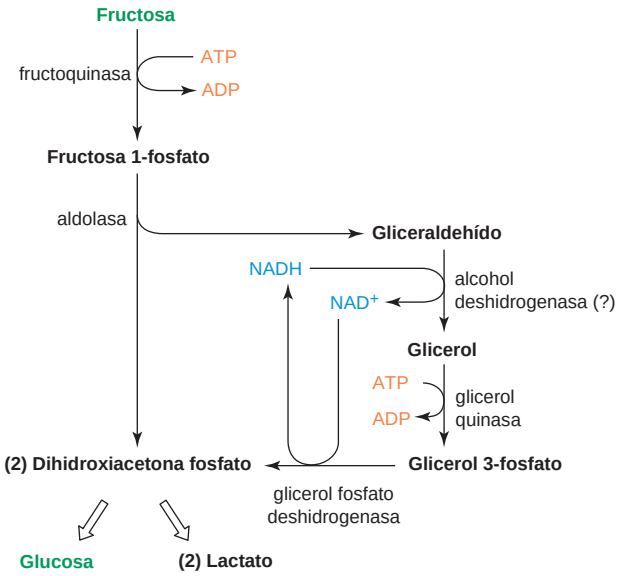


FIGURA 14.42
Ruta de la formación de glucosa a partir de la fructosa, junto con la ruta competidora de la fructólisis.
Las flechas grandes indican los pasos de las rutas glucolítica y gluconeogénica, presentadas con detalle en las Figuras 14.6 y 14.33, respectivamente.

tejidos en contacto con el semen utilizan en muy escasa medida la fructosa, permitiendo así la conservación de este sustrato para satisfacer las demandas energéticas de los espermatozoides durante su búsqueda del óvulo. Los espermatozoides contienen mitocondrias y, por consiguiente, pueden metabolizar completamente la fructosa a CO_2 y H_2O, combinando la fructólisis con la actividad del ciclo TCA.

Galactosa

El **azúcar de la leche** o **lactosa** constituye una fuente importante de **galactosa** en la dieta humana. La formación de glucosa a partir de la galactosa sigue la ruta mostrada en la Figura 14.44. La **UDP-glucosa** sirve como intermediario de reciclado en el proceso global de conversión de la **galactosa** en glucosa. La ausencia del enzima **galactosa 1-fosfato uridililtransferasa** es la causa de la mayoría de los casos de **galactosemia** (véase Apli. Clín. 15.5).

La gluconeogénesis requiere gasto de ATP

La síntesis de glucosa es costosa en términos de ATP. Se requieren 6 moléculas de ATP para la síntesis de una molécula de glucosa a partir de lactato; diez para la síntesis de glucosa a partir de alanina. El ATP necesario para la síntesis de glucosa por las célu-

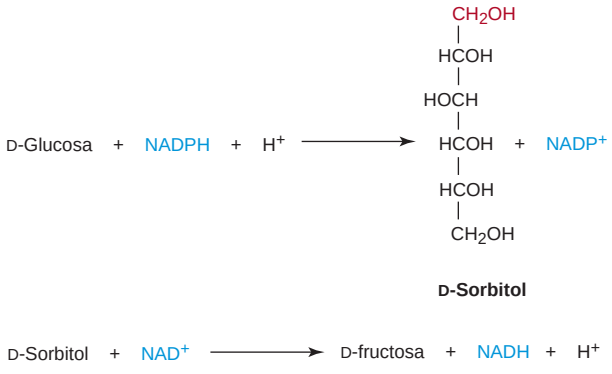


FIGURA 14.43
Ruta responsable de la formación de sorbitol y fructosa a partir de glucosa.

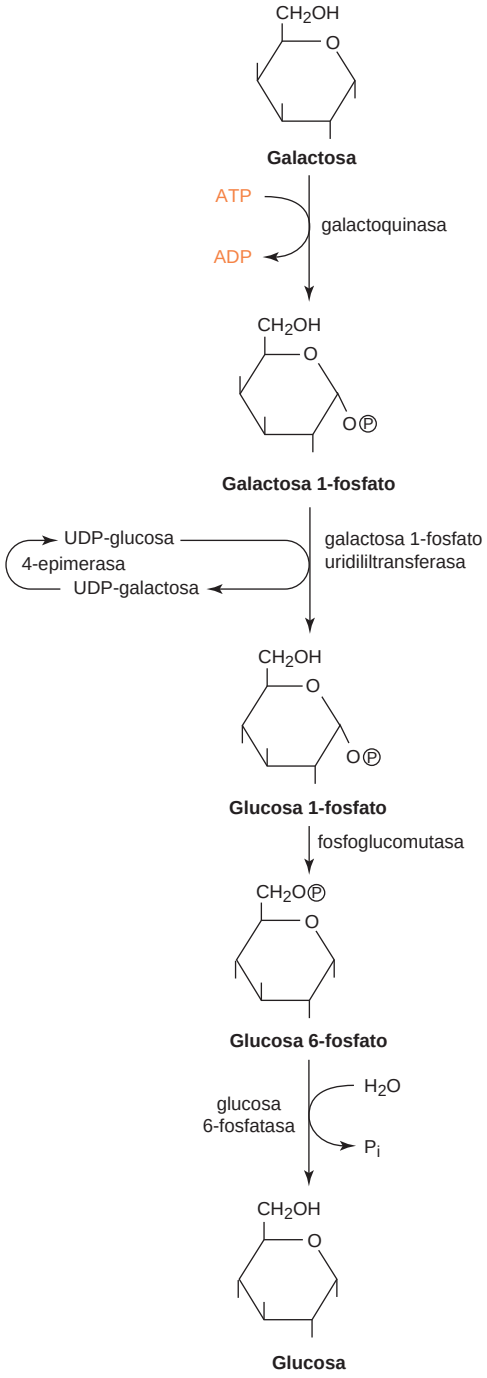


FIGURA 14.44
Ruta de formación de glucosa a partir de galactosa.

las hepáticas se obtiene en gran parte de la oxidación de ácidos grasos. Las condiciones metabólicas que se requieren del hígado para la síntesis de glucosa favorecen generalmente un aumento en la disponibilidad de ácidos grasos en la sangre. Estos ácidos grasos alcanzan las mitocondrias del hígado, en donde son oxidados a cuerpos cetónicos con la producción concomitante de grandes cantidades de ATP. Este ATP se utiliza para sostener los requerimientos energéticos de la gluconeogénesis, independientemente del sustrato que se utilice como fuente de carbono para el proceso.

La gluconeogénesis tiene varios puntos de regulación

Los puntos de regulación de la vía gluconeogénica son múltiples (véase Figura 14.45). En la regulación de la ruta se hallan involucrados principalmente aquellos enzimas utilizados para "sortear" los pasos irreversibles de la glucólisis, a saber, piruvato car-

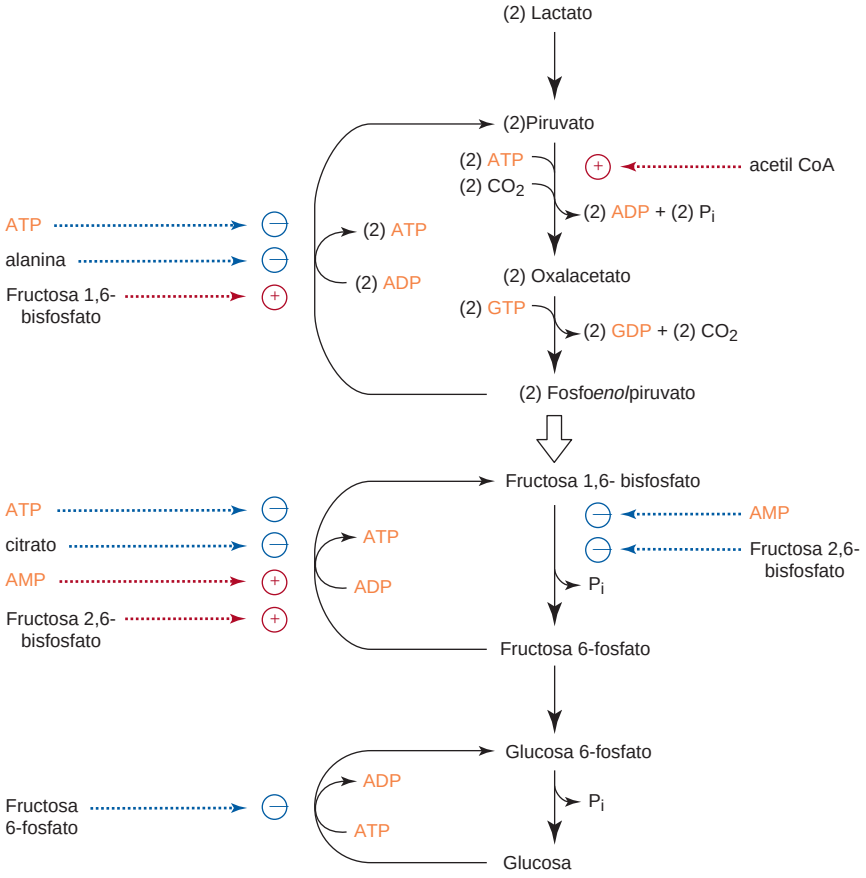


FIGURA 14.45
Aspectos reguladores alostéricos importantes de la vía gluconeogénica.

boxilasa, PEP carboxiquinasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y glucosa 6-fosfatasa. La regulación de la gluconeogénesis hepática es muy similar a la regulación de la glucólisis hepática. La inhibición de la glucólisis en sus puntos reguladores principales, o la represión de la síntesis de los enzimas involucrados en estos sitios (glucoquinasa, 6-fosfofructo-1-quinasa y piruvato quinasa) incrementan en gran medida la efectividad de los enzimas gluconeogénicos opuestos. Por consiguiente, la puesta en marcha de la gluconeogénesis se consigue, en gran parte, desconectando la glucólisis.

La **oxidación de los ácidos grasos** tiene lugar, invariablemente, de manera conjunta con la gluconeogénesis. Promueve la síntesis de glucosa, en parte porque proporciona ATP para el proceso, y en parte porque incrementa la concentración de estado estacionario del acetil CoA mitocondrial y del NADH. Estos dos productos de la oxidación de los ácidos grasos son potentes activadores de la **piruvato deshidrogenasa quinasa**, que fosforila e inactiva el complejo de la piruvato deshidrogenasa. Esto impide que el piruvato se convierta en acetil CoA por lo que se conserva el piruvato para la síntesis de glucosa. El acetil CoA es también un efector alostérico positivo de la piruvato carboxilasa, lo que, combinado con la inhibición del **complejo de la piruvato deshidrogenasa**, sirve para dirigir el carbono del piruvato hacia el oxalacetato para la síntesis de glucosa. El incremento de oxalacetato debido al incremento de la actividad piruvato carboxilasa junto con el incremento de acetil CoA tiene como consecuencia una mayor síntesis de citrato, efector alostérico negativo de la 6-fosfofructo-1-quinasa. Un efecto secundario de la inhibición de la 6-fosfofructo-1-quinasa es un descenso en la concentración de fructosa 1,6-bisfosfato, activador de la piruvato quinasa. Esto disminuye el flujo de PEP a piruvato por la piruvato quinasa e incrementa la efectividad de los esfuerzos combinados de la piruvato carboxilasa y de la PEP carboxiquinasa en la conversión del piruvato en PEP. Un aumento en los niveles de ATP, con el descenso correspondiente en los niveles de AMP, favorece la gluconeogénesis, al inhibir la 6-fosfofructo-1-quinasa y la piruvato quinasa y activar la fructosa-1,6-bisfosfatasa (véase la Figura 14.45 y ladiscusión sobre la regulación de la glucólisis, p. 614). Una insuficiencia de oxígeno para la respiración, una insuficiencia de ácidos grasos que puedan ser oxida-

dos, o cualquier inhibición o desacoplamiento de la fosforilación oxidativa haría que el hígado conmute de la gluconeogénesis a la glucólisis.

El control hormonal de la gluconeogénesis es crítico para la homeostasis

El control hormonal de la gluconeogénesis se basa en la regulación del suministro de ácidos grasos al hígado y en la actividad de los enzimas, tanto de la vía glucolítica como de la gluconeogénica. Al promover la lipólisis en el tejido adiposo, el glucagón incrementa los ácidos grasos en el plasma, acción opuesta a la de la insulina. La mayor disponibilidad de ácidos grasos conduce a una mayor oxidación de ácidos grasos por el hígado, lo cual promueve la síntesis de glucosa. La insulina tiene el efecto opuesto debido a su capacidad de inhibir la lipólisis en el tejido adiposo. El glucagón y la insulina también regulan la gluconeogénesis directamente en el hígado al influir sobre el estado de fosforilación de los enzimas hepáticos sujetos a modificación covalente. Tal como ya se discutió anteriormente (Figura 14.30), la piruvato quinasa es activa en la forma desfosforilada, e inactiva cuando se halla fosforilada. El glucagón activa a la adenilil ciclasa que produce cAMP, el cual a su vez activa la proteína quinasa A, la cual, a su vez, fosforila e inactiva a la piruvato quinasa. La inactivación de este enzima glucolítico estimula la ruta opuesta (la gluconeogénesis) al bloquear la conversión inútil de PEP en piruvato. El glucagón también estimula la gluconeogénesis a nivel de la conversión de la fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato al disminuir los niveles hepáticos de **fructosa 2,6-bisfosfato.** La fructosa 2,6-bisfosfato es un activador alostérico de la 6-fosfofructo-1-quinasa y un inhibidor alostérico de la fructosa 1,6-bisfosfatasa. El glucagón, a través de su segundo mensajero, el cAMP, disminuye los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato, al estimular la fosforilación del enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa. La fosforilación de este enzima inactiva la actividad quinasa que fabrica la fructosa 2,6-bisfosfato a partir de la F6P, pero activa la fosfatasa que hidroliza la fructosa 2,6-bisfosfato a F6P. La consecuencia es una caída en el nivel de fructosa 2,6-bisfosfato, inducida por glucagón, que conduce a la disminución de la actividad de la 6-fosfofructo-1-quinasa al tiempo que la fructosa 1,6-bisfosfatasa aumenta su actividad (Figura 14.45). El efecto global de todo ello es el incremento de la conversión de FBP en F6P, y en consecuencia, de la velocidad de la gluconeogénesis. El incremento resultante en fructosa 6-fosfato también favorece la gluconeogénesis por inhibición de la glucoquinasa mediante su proteína reguladora (véase la exposición sobre la regulación de la glucólisis, p. 615). La insulina provoca efectos contrarios a los del glucagón al señalar la activación de la cAMP fosfodiesterasa, la inhibición de la proteína quinasa A y la activación de la fosfoproteína fosfatasa (véase la discusión de los efectos reguladores de la insulina, p. 622).

El glucagón y la insulina también tienen efectos a largo plazo sobre la glucólisis y la gluconeogénesis hepáticas por **inducción** y **represión** de la síntesis de enzimas clave de estas rutas. Una proporción elevada glucagón/insulina en la sangre incrementa la capacidad enzimática de gluconeogénesis y disminuye la capacidad enzimática de glucólisis en el hígado. Una proporción baja glucagón/insulina tiene efectos opuestos. La proporción glucagón/insulina aumenta cuando se necesita gluconeogénesis y disminuye cuando la glucosa es abundante por entrada desde el tracto gastrointestinal. El glucagón señaliza la inducción de la síntesis de mayores cantidades de PEP carboxiquinasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, glucosa 6-fosfatasa y varias aminotransferasas. La Figura 14.46 muestra un modelo de cómo ocurre esta inducción. La unión del glucagón a su receptor en la membrana plasmática provoca un aumento de cAMP, el cual activa la proteína quinasa A. La proteína quinasa A fosforila entonces una proteína denominada **proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP** (*c-AMP-response element binding protein*, **CREB**), un factor de acción en trans que en su forma fosforilada se puede unir a un **elemento de respuesta al cAMP (CRE)**, que es un elemento que actúa en cis dentro de la región reguladora de los genes que responden a cAMP. Esto promueve la transcripción de genes que codifican enzimas clave de la gluconeogénesis, tales como la **PEP carboxiquinasa** (Figura 14.46). Mediante un mecanismo similar, pero que causa la represión de la transcripción génica, el glucagón provoca la disminución de la cantidad de glucoquinasa, 6-fosfofructo-1-quinasa, y piruvato quinasa. La insulina tiene una acción opuesta a la del glucagón (Figura 14.46), y actúa a través de una cascada de señales que resulta en la activación de una **proteína de unión al elemento de respuesta**

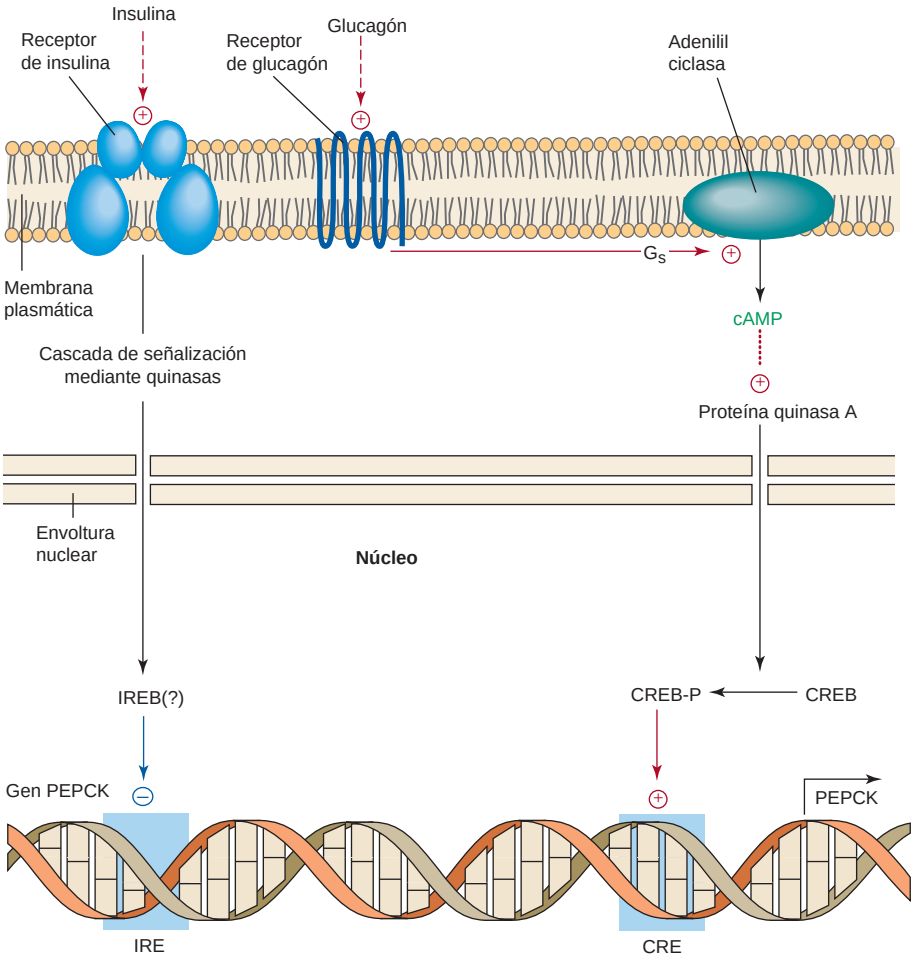


FIGURA 14.46
El glucagón promueve la transcripción del gen que codifica la PEP carboxiquinasa. Abreviaturas: PEPCK, PEP carboxiquinasa; CRE, elemento de respuesta al cAMP; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP; IRE, elemento de respuesta a la insulina; IREB proteína de unión al elemento de respuesta a la insulina.

a insulina (IREB), que inhibe la transcripción de genes que codifican enzimas clave de la gluconeogénesis, a través de su unión a un **elemento de respuesta a insulina (IRE)** en la región reguladora de estos genes. Cuando no es necesaria la síntesis de glucosa, la síntesis de enzimas clave de la gluconeogénesis se desactiva y se pone en marcha la síntesis de enzimas glucolíticos clave como consecuencia de la disminución en la proporción glucagón/insulina en la sangre.

La ingestión de etanol inhibe la gluconeogénesis

El etanol inhibe la gluconeogénesis en el hígado (Apli. Clín. 14.10). El etanol se oxida principalmente en el hígado, produciendo una gran carga de equivalentes de reducción que deben ser transportados a la mitocondria por la **lanzadera del malato–aspartato**. Este exceso de NADH en el citosol crea problemas para la gluconeogénesis hepática, ya que fuerza el equilibrio de las reacciones catalizadas por la lactato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa en las direcciones de formación de lactato y malato, respectivamente:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \rightarrow \underset{\text{Acetaldehído}}{CH_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}H} + NADH + H^+$$

$$\text{piruvato} + NADH + H^+ \rightarrow \text{lactato} + NAD^+$$

$$\text{Suma:} \quad \text{etanol} + \text{piruvato} \rightarrow \text{acetaldehído} + \text{lactato}$$

o

$$\text{oxalacetato} + NADH + H^+ \rightarrow \text{malato} + NAD^+$$

$$\text{Suma:} \quad \text{etanol} + \text{oxalacetato} \rightarrow \text{acetaldehído} + \text{malato}$$

Esto inhibe la síntesis de glucosa, al limitar la disponibilidad de piruvato y oxalacetato para las reacciones catalizadas por la piruvato carboxilasa y la PEP carboxiquinasa respectivamente.

14.6 | GLUCOGENÓLISIS Y GLUCOGENOGÉNESIS

Se utiliza glucógeno, forma de almacenamiento de la glucosa, como fuente rápida de energía

La **glucogenólisis** hace referencia a la degradación de glucógeno a glucosa o glucosa 6-fosfato; la **glucogenogénesis** hace referencia a la síntesis de glucógeno. Estos procesos tienen lugar en casi todos los tejidos, aunque de manera especial en el músculo y en el hígado debido a la mayor impotancia del glucógeno como combustible de reserva en estos tejidos. El **hígado** tiene una gran capacidad para almacenar glucógeno. En una persona bien nutrida el contenido de **glucógeno hepático** puede constituir hasta el 10% del peso húmedo de este órgano. El **músculo** almacena menos glucógeno cuando se expresa de esta forma: un máximo de sólo 1–2% de su peso húmedo. Sin embargo, dado que la persona media tiene más músculo que hígado, la cantidad de glucógeno total en el músculo es doble que la del hígado.

Los depósitos de glucógeno muscular y hepático desempeñan papeles completamente diferentes. El **glucógeno muscular** sirve como combustible de reserva para la síntesis de ATP en este tejido, mientras que el glucógeno hepático funciona como reserva de glucosa para el mantenimiento de las concentraciones de glucosa sanguínea. Las cantidades de glucógeno hepático varían ampliamente en respuesta a la ingestión de alimento; poco después de la ingesta se acumulan grandes cantidades que luego disminuyen lentamente a medida que son movilizadas para ayudar al mantenimiento de un nivel de glucosa sanguínea prácticamente constante (véase Figura 14.47). Las reservas de glucógeno hepático son movilizadas entre comidas, y aún en mayor extensión durante el ayuno nocturno. Tanto en el ser humano como en la rata el almacén de glucógeno hepático puede durar entre 12 y 24 horas durante el ayuno, dependiendo en gran medida, por supuesto, de si el individuo está enjaulado o corriendo libremente.

El glucógeno almacenado en el músculo se utiliza como fuente de ATP para una actividad muscular aumentada. La mayor parte de la glucosa del glucógeno se consume dentro de las células musculares sin que se produzca formación de glucosa libre como intermediario. Sin embargo, debido a una peculiaridad del catabolismo del glucógeno, que se tratará más adelante, alrededor del 8% del glucógeno muscular se convierte en glucosa libre dentro del tejido. Parte de esta glucosa se libera en el torrente circulatorio, pero la mayor parte se metaboliza por la ruta glucolítica en el músculo. Dado que las células musculares carecen de glucosa 6-fosfatasa y, dado también que la mayor parte de la glucosa libre producida durante la degradación del glucógeno se cataboliza seguidamente, el glucógeno muscular no es cuantitativamente importante para el mantenimiento de los niveles de glucosa sanguínea durante el ayuno. Por el contrario, la conversión del glucógeno hepático a glucosa por la glucogenólisis y la glucosa 6-fosfatasa, es de mucha mayor importancia como fuente de glucosa sanguínea durante el ayuno. La conversión de glucosa en glucógeno en el músculo juega

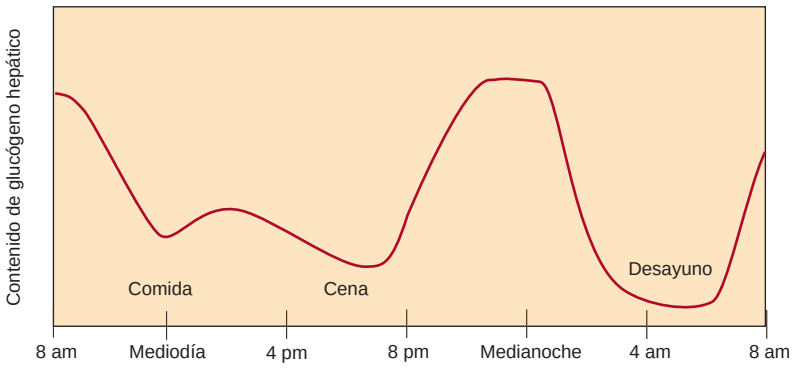
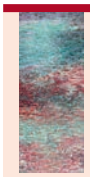


FIGURA 14.47
Variación de los niveles de glucógeno hepático entre comidas y durante el ayuno nocturno.



APLICACIÓN CLÍNICA 14.10
Hipoglucemia e intoxicación alcohólica

El consumo de alcohol, especialmente por una persona desnutrida, puede producir hipoglucemia. El mismo efecto puede tener lugar al beber alcohol después de un ejercicio enérgico. En ambos casos, la hipoglucemia se debe a los efectos inhibidores del alcohol sobre la gluconeogénesis hepática y, por tanto, tiene lugar en condiciones de carencia de glucógeno hepático. El problema es debido al NADH producido durante el metabolismo del alcohol. El hígado no puede simplemente utilizar de manera lo suficientemente rápida los equivalentes de reducción producidos por la oxidación del etanol para evitar los trastornos metabólicos. Los equivalentes de reducción extra bloquean la conversión de lactato en glucosa y promueven la conversión de alanina en lactato, lo que da lugar a una considerable acumulación de lactato en la sangre. Dado que el lactato no tiene a donde ir (véase Apli. Clín. 14.5), puede desarrollarse acidosis láctica, aunque suele ser de carácter leve.

El alcohol a dosis bajas produce un funcionamiento motor e intelectual debilitado; las dosis elevadas tienen un efecto depresivo que puede conducir a estupor y anestesia. El bajo nivel sanguíneo de azúcar puede contribuir a estos efectos indeseables del alcohol. Lo que es más, puede parecer que un paciente está sencillamente ebrio, cuando lo que está en realidad es sufriendo hipoglucemia la cual puede producir daños irreversibles en el sistema nervioso central. Los niños dependen en gran manera de la gluconeogénesis cuando ayunan, y la ingestión accidental de alcohol puede poducir una hipoglucemia grave (véase Apli. Clín. 14.9).

Krebs, H. A., Freedland, R. A., Hems, R. y Stubbs, M. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochem. J.* 112:117, 1969; y Service, F. J. Hypoglycemia. *Med. Clin. North Am.* 79:1, 1995.

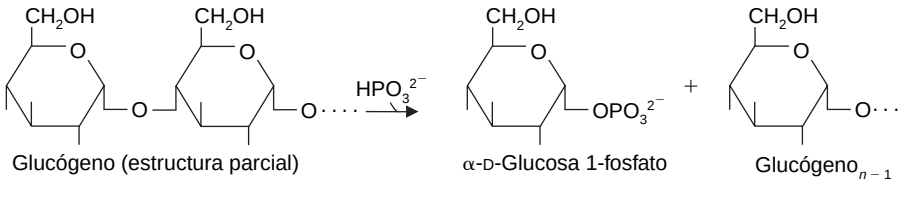
un papel importante en la disminución de los niveles de glucosa sanguíneos que han sido elevados por una comida rica en glúcidos. La glucogenogénesis en el hígado también contribuye a la disminución de la glucosa sanguínea pero es menos importante en este aspecto que la síntesis de glucógeno en el músculo.

El **ejercicio** de un músculo desencadena la movilización del glucógeno muscular para proporcionar ATP. El rendimiento de ATP y el destino del carbono del glucógeno depende de si se trata de una fibra muscular "blanca" o "roja". Las **fibras musculares rojas** disponen de un flujo sanguíneo rico, contienen grandes cantidades de mioglobina y están rellenas de mitocondrias. El glucógeno movilizado en estas células se convierte en piruvato, el cual, debido a la disponibilidad de O_2 y mitocondrias, puede convertirse en CO_2 y H_2O. Por el contrario, las **fibras musculares blancas** tienen menos mioglobina y menos mitocondrias. La glucogenólisis dentro de este tejido suministra sustratos para la glucólisis, siendo el producto final fundamentalmente lactato. Las fibras musculares blancas tienen una enorme capacidad para la glucogenólisis y para la glucólisis, mucho mayor que la de las fibras musculares rojas. Sin embargo, dado que sus depósitos de glucógeno son limitados, los músculos de este tipo sólo pueden funcionar a completo rendimiento durante períodos de tiempo relativamente cortos. El músculo pectoral y el corazón de la gallina son buenos ejemplos de músculos blanco y rojo, respectivamente. El corazón ha de latir continuamente, por lo que dispone de muchas mitocondrias y un suministro rico de sangre a través de las arterias coronarias. El corazón almacena glucógeno para utilizarlo cuando se le impone una mayor carga de trabajo. El músculo pectoral de la gallina no realiza trabajo de una forma continua. Su principal función es permitir al animal volar rápidamente durante cortas distancias como, por ejemplo, cuando huye de los depredadores (o de gallos amorosos). Debido a la gran velocidad de movilización del glucógeno, el músculo pectoral está diseñado para tener una máxima actividad durante períodos de tiempo relativamente cortos. Aunque en la gallina es más sencillo diferenciar entre músculos blancos y rojos, ya que ambos son fácilmente reconocibles, la mayor parte de los músculos esqueléticos del cuerpo humano están compuestos por una mezcla de fibras rojas y blancas, capaces de proporcionar tanto una contracción muscular rápida como sostenida. La distribución de fibras musculares blancas y rojas en secciones de un músculo esquelético humano se pone fácilmente de manifiesto utilizando procedimientos de tinción especiales (Figura 14.48).

En el hígado del animal bien nutrido se hallan abundantes **gránulos de glucógeno**, pero que están virtualmente ausentes del hígado de un animal tras 24 horas de ayuno (Figura 14.49). El ejercicio intenso produce la misma pérdida de gránulos de glucógeno en las fibras musculares. Estos gránulos de glucógeno corresponden a grupos de moléculas de glucógeno con masas moleculares que pueden acercarse a 2×10^7 Da. El glucógeno está compuesto por residuos glucosilo, la mayoría de los cuales están unidos por enlaces glucosídicos α-1,4- (Figura 14.50). En la molécula de glucógeno también aparecen ramificaciones debido a frecuentes enlaces glucosídicos α-1,6- (Figura 14.50). Una rama del "árbol" del glucógeno (Figura 14.51) se caracteriza por ramificaciones cada cuatro residuos glucosilo dentro del núcleo más central de la molécula. Estas ramificaciones son mucho menos frecuentes en la parte externa de la molécula. Una pregunta interesante, que intentaremos contestar más adelante, es por qué este polímero está constituido por tantas ramas intrincadas y cabos sueltos. Ciertamente, el glucógeno contrasta en esto con las proteínas y los ácidos nucleicos, pero ésta es, lógicamente, la forma de almacenamiento apropiada para un combustible que nunca tendrá que catalizar una reacción o transportar información dentro de una célula.

La glucógeno fosforilasa cataliza el primer paso de la degradación del glucógeno

La **glucógeno fosforilasa** cataliza la **fosforólisis** del glucógeno, reacción en la que el P_i se utiliza para romper el enlace glucosídico α-1,4 para dar glucosa 1-fosfato (Figura 14.52). Esto tiene lugar siempre en uno de los muchos extremos terminales, no reductores, de la molécula de glucógeno:



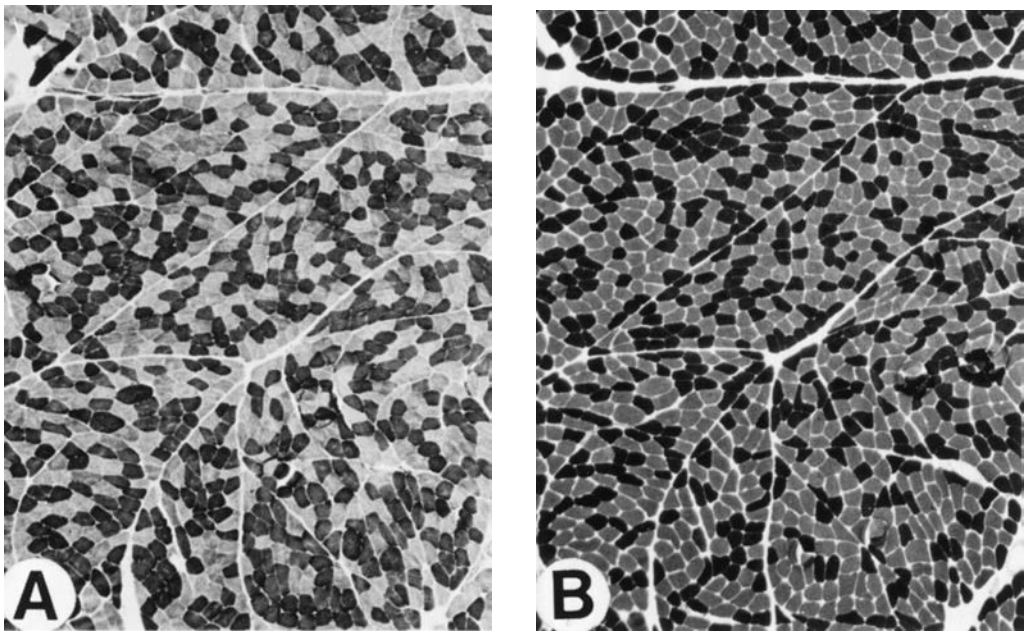


FIGURA 14.48
Sección de músculo esquelético humano mostrando las fibras musculares rojas y blancas.
Las secciones se tiñeron según la actividad NADH diaforasa en (A) y para la actividad ATPasa en (B). Las fibras rojas son oscuras y las fibras blancas son claras en (A); viceversa en (B).
Fotografías proporcionadas generosamente por el Dr. Michael H. Brooke del Jerry Lewis Neuromuscular Research Center, St. Louis, Missouri.

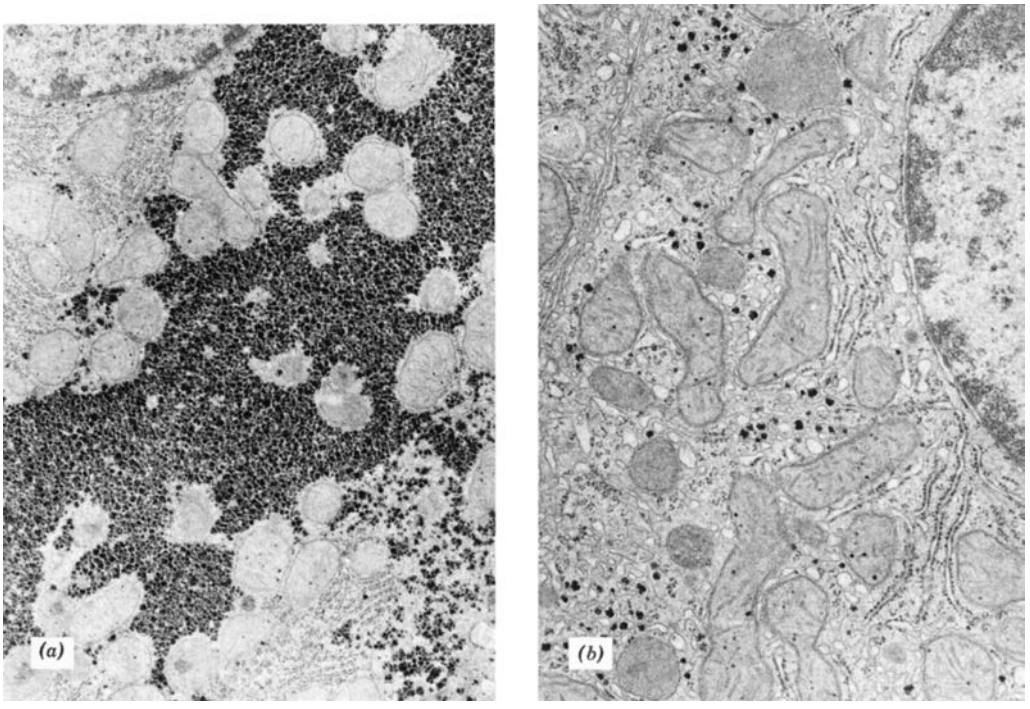
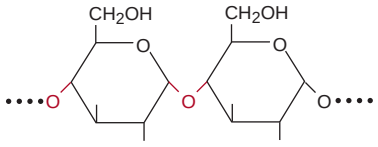
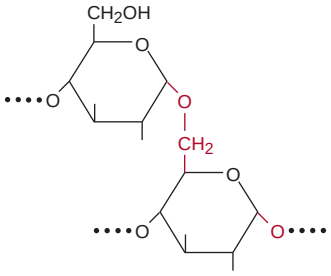


FIGURA 14.49
Micrografías electrónicas mostrando los gránulos de glucógeno (material teñido de oscuro) en el hígado de una rata bien alimentada (*a*), y ausencia relativa de tales gránulos en el hígado de una rata en ayuno durante 24 h (*b*).
Micrografías proporcionadas generosamente por el Dr. Robert R. Cardell del Departamento de Anatomía de la Universidad de Cincinnati.



Enlace α-1,4-Glucosídico

(a)



Enlace α-1,6-Glucosídico

(b)

FIGURA 14.50
En el glucógeno se presentan dos tipos de enlace entre moléculas de glucosa.

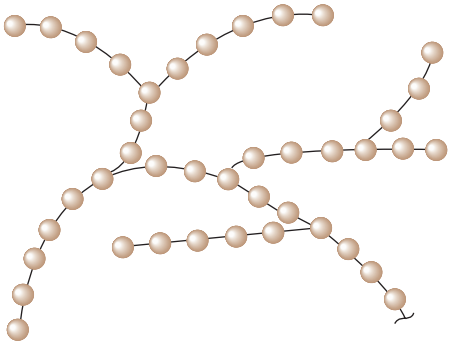


FIGURA 14.51
Estructura ramificada del glucógeno.

Debe distinguirse cuidadosamente entre la reacción catalizada por la glucógeno fosforilasa y la catalizada por la α-amilasa, enzima responsable de la degradación del glucógeno y almidón en el intestino (véase p. 1101). La α-amilasa actúa por hidrólisis simple, utilizando agua en lugar de fosfato inorgánico para romper los enlaces glucosídicos α-1,4. Aunque una molécula de glucógeno puede contener hasta 100 000 residuos de glucosa, puede abreviarse simplemente su estructura como $(glucosa)_n$ en donde n hace referencia al número de residuos glucosilo en la molécula. La reacción catalizada por la glucógeno fosforilasa se puede escribir

$$(Glucosa)_n + P_i^{2-} \rightarrow (glucosa)_{n-1} + \alpha\text{-D-glucosa 1-fosfato}^{2-}$$

El paso siguiente de la degradación del glucógeno está catalizado por la **fosfoglucomutasa**:

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \rightarrow \text{glucosa 6-fosfato}$$

Esta reacción se encuentra próxima al equilibrio en condiciones intracelulares, lo que le permite funcionar tanto en la degradación como en la síntesis del glucógeno. Como la fosfogliceratomutasa (véase p. 607), un compuesto bisfosfato es un intermedio obligado:

$$\text{E-P + glucosa 1-fosfato} \rightarrow \text{E + glucosa 1,6-bisfosfato}$$

$$\text{E + glucosa 1,6-bisfosfato} \rightarrow \text{E-P + glucosa 6-fosfato}$$

$$\text{Suma: glucosa 1-fosfato} \rightarrow \text{glucosa 6-fosfato}$$

Para que se produzca la reacción ha de hallarse presente una cantidad catalítica de glucosa 1,6-bisfosfato. Con este objetivo específico, es producido en pequeñas cantidades por un enzima denominado **fosfoglucoquinasa**:

$$\text{Glucosa 6-fosfato} + \text{ATP} \rightarrow \text{glucosa 1,6-bisfosfato} + \text{ADP}$$

El siguiente enzima implicado en la glucogenólisis depende del tejido considerado (Figura 14.52). En el hígado, la glucosa 6-fosfato producida en la glucogenólisis es hidrolizada por la **glucosa 6-fosfatasa**, dando glucosa libre:

$$\text{Glucosa 6-fosfato}^{2-} + H_2O \rightarrow \text{glucosa} + P_i^{2-}$$

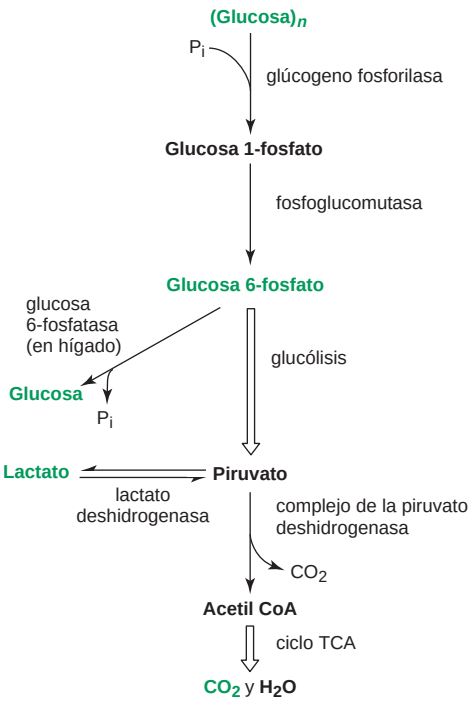


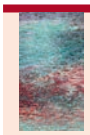
FIGURA 14.52
Glucogenólisis y destino del glucógeno degradado en el hígado frente a su destino en tejidos periféricos.

La carencia de este enzima, o de la translocasa que transporta la G6P al retículo endoplasmático (Figura 14.37), dan lugar a la enfermedad de almacenamiento del glucógeno tipo I (Apli. Clín. 14.11). La ecuación global igualada para la eliminación de un residuo glucosilo del glucógeno por glucogenólisis en el hígado es, pues,

$$(\text{Glucosa})_n + H_2O \rightarrow (\text{glucosa})_{n-1} + \text{glucosa}$$

Dicho de otro modo, la glucogenólisis en el hígado implica fosforólisis, pero, dado que una fosfatasa rompe el éster fosfato, la reacción global resulta ser la hidrólisis del glucógeno. No se utiliza ni se forma ATP en el proceso de glucogenólisis.

En los tejidos periféricos, la G6P generada por la glucogenólisis se utiliza en la ruta glucolítica, la cual conduce principalmente a la generación de lactato en las fi-



APLICACIÓN CLÍNICA 14.11
Enfermedades de almacenamiento del glucógeno

Existen una serie de enfermedades de almacenamiento del glucógeno bien caracterizadas, debidas todas ellas a deficiencias heredadas de uno o más enzimas implicados en la síntesis y degradación del glucógeno. El hígado es, normalmente, el tejido más afectado, pero también pueden ser defectuosos los metabolismos del corazón y del músculo.

Chen, Y.-T. y Burchell, A. Glycogen storage diseases. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, pp. 935.

Enfermedad de von Gierke

La enfermedad de almacenamiento del glucógeno más común, conocida como enfermedad tipo I o de von Gierke, está producida por una deficiencia de la glucosa 6-fosfatasa del hígado, la mucosa intestinal y el riñón, Así, es posible el diagnóstico mediante una pequeña biopsia del intestino delgado. Los pacientes con esta enfermedad se pueden agrupar en aquellos que carecen del enzima glucosa-6-fosfatasa per se (tipo Ia), y los que carecen de glucosa 6-fosfato translocasa (tipo Ib) (véase Figura 14.37). Una anomalía genética en la hidrólisis de glucosa 6-fosfato aparece sólo en una persona de cada 200 000, y se transmite como un carácter autosómico recesivo. Las manifestaciones clínicas comprenden hipoglucemia en ayuno, acidemia láctica, hiperlipidemia e hiperuricemia con artritis gotosa. La hipoglucemia en ayuno se explica fácilmente como consecuencia de la ausencia de glucosa 6-fosfatasa, enzima requerido para obtener glucosa a partir del glucógeno hepático y de la gluconeogénesis. El hígado de estos pacientes libera algo de glucosa, por acción del enzima desramificante. La acidemia láctica aparece porque el hígado no puede utilizar de modo efectivo el lactato para la síntesis de glucosa. Además, en respuesta al glucagón, el hígado produce ácido láctico de forma inadecuada. Esta hormona debería desencadenar la liberación de glucosa sin producción de lactato; no obstante, ocurre lo contrario, debido a la carencia de glucosa 6-fosfatasa. La hiperuricemia proviene del incremento de la degradación de purinas en el hígado; la hiperlipidemia se debe al aumento en la disponibilidad de ácido láctico para la lipogénesis, y a la movilización de lípidos del tejido adiposo, provocadas por los elevados niveles de glucagón, que son una respuesta a la hipoglucemia. Los síntomas de la enfermedad de von Gierke pueden aliviarse notablemente si se administran glúcidos a lo largo del día, a fin de evitar una hipoglucemia. Durante el sueño, dicha administración puede realizarse mediante la infusión de glúcidos en el intestino a través de un tubo nasogástrico.

Cori, G. T. y Cori, C. F. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem.* 199:661, 1952.

Enfermedad de Pompe

La enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II o enfermedad de Pompe es producida por la ausencia de α-1,4-glucosidasa (o maltasa ácida), enzima que normalmente se encuentra en los lisosomas. La ausencia de este enzima conduce a la acumulación de glucógeno en virtualmente todos los tejidos. Esto es algo sorprendente si no se sabe que los lisosomas captan gránulos de glucógeno y se vuelven defectuosos respecto a otras funciones cuando carecen de la capacidad necesaria para destruir los gránulos. Dado que otras rutas sintéticas y degradativas del metabolismo del glucógeno están intactas, no se aprecian aquí trastornos metabólicos como los que se observan en la enfermedad de von Gierke. No se conoce la razón de la acumulación de glucógeno extralisosómico. Se produce una cardiomegalia masiva que conduce en una edad temprana a la muerte por fallo cardíaco.

Hers, H. G. α-Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem. J.* 86:11, 1963.

Enfermedad de Cori

También denominada enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo III, la enfermedad de Cori está producida por una deficiencia del enzima desramificante del glucógeno. El glucógeno se acumula debido a que sólo las ramas exteriores pueden ser eliminadas de la molécula por la fosforilasa. Aparece hepatomegalia, aunque ésta disminuye con la edad. Las manifestaciones clínicas son similares, aunque mucho más benignas, a las de la enfermedad de von Gierke, debido a que aquí no queda afectada la gluconeogénesis, por lo que la hipoglucemia y sus complicaciones son mucho menos graves.

Van Hoff, F. y Hers, H. G. The subgroups of type III glycogenosis. *Eur. J. Biochem.* 2:265, 1967.

Enfermedad de McArdle

También denominada enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo V, la enfermedad de McArdle se debe a la ausencia de fosforilasa muscular. Los pacientes sufren calambres musculares dolorosos y no pueden realizar ejercicios vigorosos, probablemente porque los depósitos de glucógeno muscular no están disponibles para el músculo en ejercicio. Así, no se produce el incremento normal del lactato plasmático (liberado del músculo) después del ejercicio. Los músculos se dañan debido probablemente al suministro inadecuado de energía y a la acumulación de glucógeno. Es frecuente la liberación de enzimas musculares (creatina fosfoquinasa, aldolasa) y mioglobina; los elevados niveles de dichas sustancias en la sangre sugieren un trastorno muscular.

McArdle, B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin. Sci.* 10:13, 1951.

bras musculares blancas y a la oxidación completa a CO_2 en las fibras musculares rojas. Ya que no se ha de invertir ATP para formar la G6P obtenida del glucógeno, la ecuación global de la glucogenólisis seguida de glucólisis es

$$(\text{Glucosa})_n + 3\ \text{ADP}^{3-} + 3\ \text{P}_\text{i}^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow (\text{glucosa})_{n-1} + 2\ \text{lactato}^- + 3\ \text{ATP}^{4-} + 2\ \text{H}_2\text{O}$$

Se necesita un enzima desramificante para completar la hidrólisis del glucógeno

El primer enzima involucrado en la degradación del glucógeno, la glucógeno fosforilasa, es específico para enlaces glucosídicos α-1,4. Sin embargo, deja de atacar enlaces α-1,4 glucosídicos a cuatro residuos glucosilo de distancia de un punto de ramificación α-1,6. Una molécula de glucógeno que haya sido degradada hasta el límite impuesto por las ramificaciones se denomina dextrina límite de la fosforilasa. La acción de un **enzima desramificante** es lo que permite que la glucógeno fosforilasa continúe degradando el glucógeno. Este enzima desramificante es un enzima bifuncional que cataliza dos reacciones necesarias para la desramificación del glucógeno. La primera es una actividad **4-α-D-glucano transferasa** en la que se elimina una cadena de tres residuos glucosilo desde una ramificación de cuatro residuos glucosilo de la molécula de glucógeno (Figura 14.53). La cadena permanece unida covalentemente al enzima hasta que puede ser transferida a un 4-hidroxilo libre de un residuo glucosilo situado al final de la misma molécula de glucógeno o de una molécula adyacente. El resultado es una cadena de amilosa más larga, y con

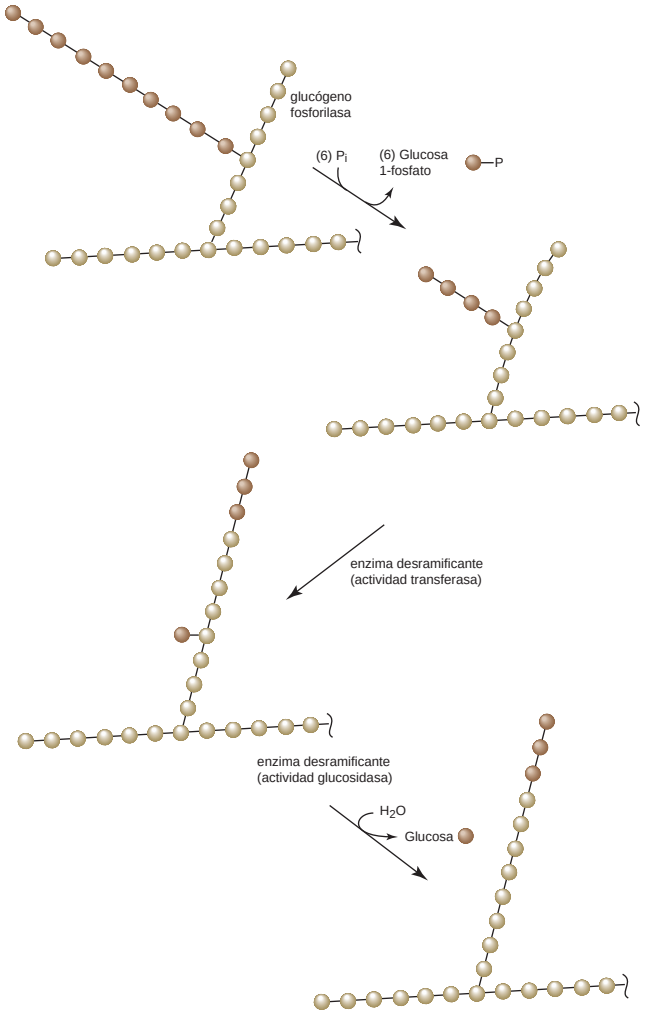
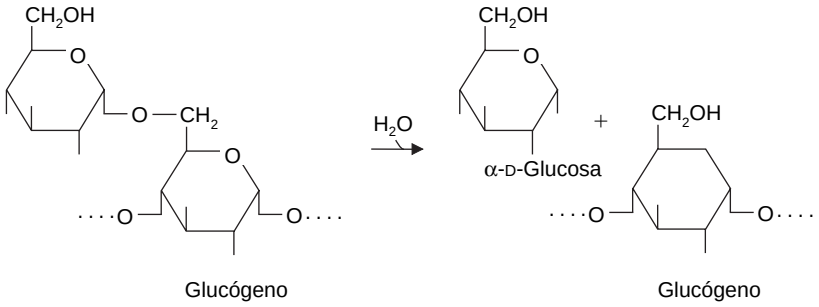


FIGURA 14.53
Acción del enzima desramificante del glucógeno.

un solo residuo glucosilo aún en enlace α-1,6. Este enlace se rompe hidrolíticamente por la otra acción enzimática del enzima desramificante, es decir, por la actividad **amilo-α-1,6-glucosidasa** de éste:



La acción cooperativa y repetitiva de la fosforilasa y del enzima desramificante conduce a la fosforólisis e hidrólisis completa del glucógeno. Las **enfermedades de almacenamiento de glucógeno** se producen cuando cualquiera de estos enzimas es defectuoso. Una molécula media de glucógeno da alrededor de 12 moléculas de glucosa 1-fosfato por acción de la fosforilasa, por cada molécula de glucosa libre producida por acción del enzima desramificante.

Hay otra ruta para la degradación del glucógeno que no es tan importante cuantitativamente. Un defecto en esta vía minoritaria causa sin embargo un problema importante. Tal como se expone en la Apli. Clín. 14.11, existe una **glucosidasa** presente en los **lisosomas** que degrada el glucógeno que entra en estos orgánulos durante el recambio normal de los componentes intracelulares.

La síntesis del glucógeno precisa enzimas específicos

La primera reacción involucrada en la **síntesis del glucógeno** (Figura 14.54) ya nos es familiar, al estar catalizada por la glucoquinasa en el tejido hepático y por la hexoquinasa en los tejidos periféricos:

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{glucosa 6-fosfato} + \text{ADP}$$

La fosfoglucomutasa, tratada en relación con la degradación del glucógeno, cataliza la siguiente reacción reversible:

$$\text{Glucosa 6-fosfato} \rightarrow \text{glucosa 1-fosfato}$$

Una reacción singular, que se encuentra en el paso siguiente, supone la formación de UDP-glucosa por acción de la **glucosa 1-fosfato uridilil transferasa**:

$$\text{Glucosa 1-fosfato} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-glucosa} + \text{PP}_i$$

Esta reacción genera UDP-glucosa, una molécula de "glucosa activada", que es utilizada para construir la molécula de glucógeno. La formación de UDP-glucosa es energéticamente favorable e irreversible gracias a la posterior hidrólisis del pirofosfato por la **pirofosfatasa**:

$$\text{PP}_i^{4-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\ \text{P}_i^{2-}$$

Glucógeno sintasa

La glucógeno sintasa cataliza la transferencia de la porción glucosilo activada de la UDP-glucosa a una molécula de glucógeno, para formar un nuevo enlace glucosídico entre el grupo hidroxilo del C-1 del azúcar activado y el C-4 de un residuo glucosilo de la cadena creciente de glucógeno. El extremo reductor de la glucosa (el C-1 de la glucosa es un aldehído que puede reducir otros compuestos durante su oxidación a ácido carboxílico) se adiciona siempre a un extremo no reductor de la cadena de glucógeno. La molécula de glucógeno, independientemente de su tamaño, tiene teóricamente, un solo extremo reductor libre, escondido dentro del núcleo central. El UDP formado como producto de la glucógeno sintasa se convierte de nuevo en UTP por acción de la **nucleósido difosfato quinasa**:

$$\text{UDP} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{UTP} + \text{ADP}$$

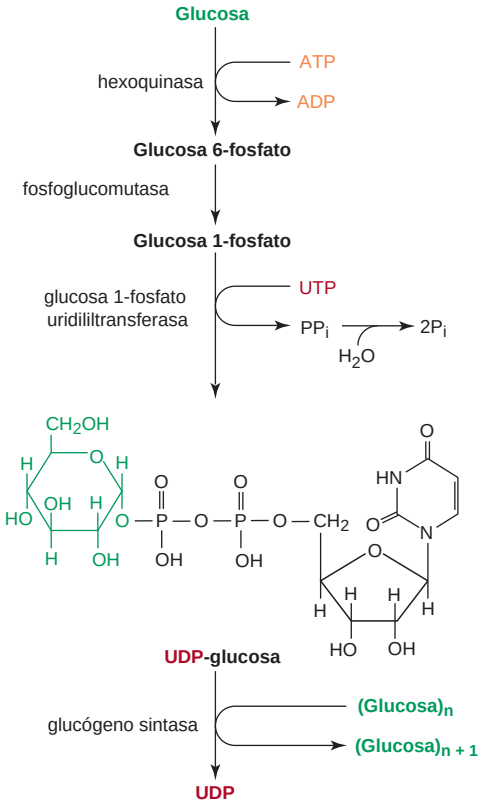


FIGURA 14.54
Ruta de síntesis del glucógeno.

La glucógeno sintasa crea cadenas de moléculas de glucosa con enlaces α-1,4 glucosídicos, pero no puede formar las ramificaciones *α*-1,6 glucosídicas. Su acción aislada sólo produciría amilosa que es un polímero lineal de glucosa con enlaces glucosídicos *α*-1,4. Una vez se ha formado una cadena de amilosa de como mínimo 11 residuos entra en acción un **enzima "ramificante"**. Su nombre real es **enzima ramificador de 1,4-*α*-glucano**, puesto que lo que hace es eliminar un bloque de aproximadamente siete residuos glucosilo desde una cadena en crecimiento y transferirlo a otra cadena donde produce un enlace *α*-1,6 (Figura 14.55). La nueva ramificación se ha de introducir al menos a cuatro residuos glucosilo de un punto de ramificación adyacente. Así, la creación de la estructura altamente ramificada del glucógeno requiere los esfuerzos concertados de la glucógeno sintasa y del enzima ramificante. La ecuación global igualada de la síntesis del glucógeno por la vía recién descrita es

$$(\text{Glucosa})_n + \text{glucosa} + 2\ \text{ATP}^{4-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{glucosa})_{n+1} + 2\ \text{ADP}^{3-} + 2\ \text{P}_\text{i}^{2-} + 2\ \text{H}^+$$

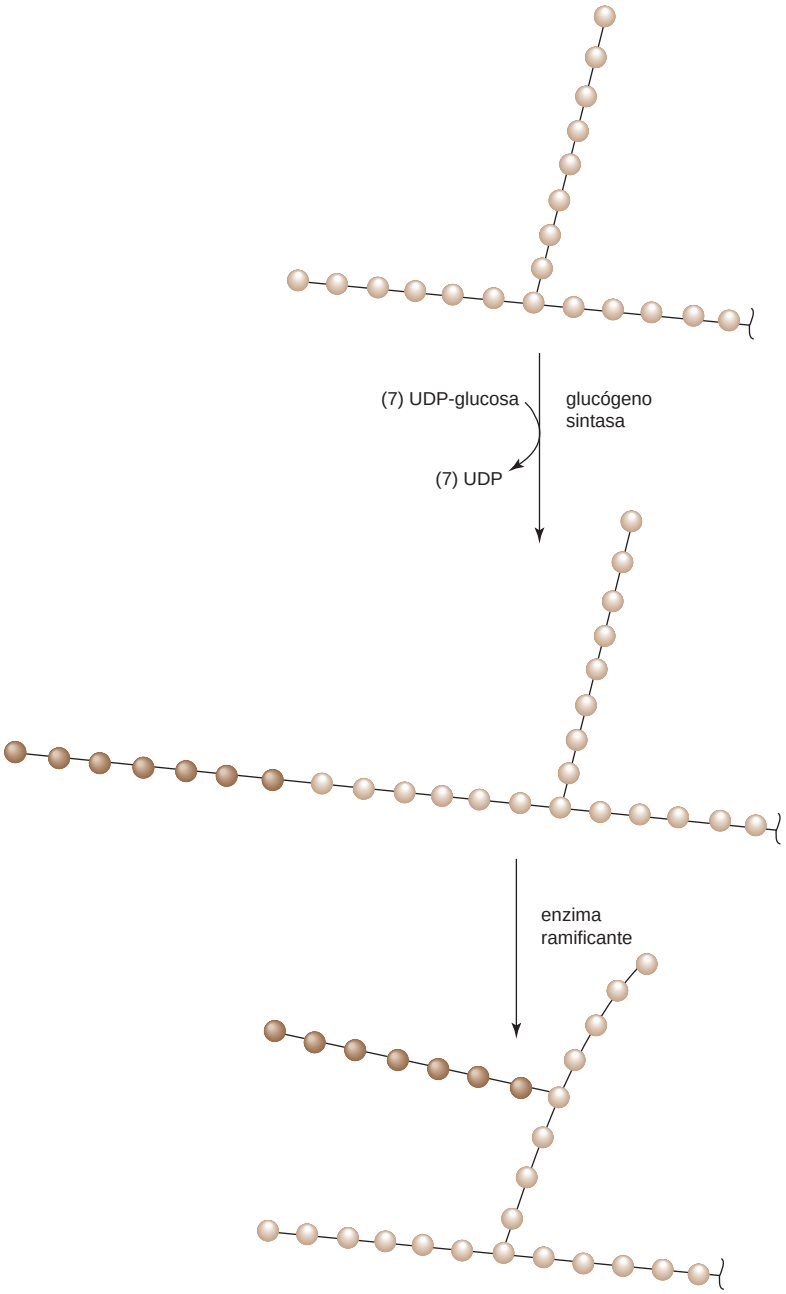


FIGURA 14.55
Acción del enzima ramificante del glucógeno.

Como ya se observó anteriormente, la combinación de la glucogenólisis y glucólisis rinde solamente tres moléculas de ATP por residuo glucosilo:

$$(\text{glucosa})_n + 3\ ADP^{3-} + 3\ P_i^{2-} + H^+ \rightarrow (\text{glucosa})_{n-1} + 2\ \text{lactato}^- + 3\ ATP^{4-} + 2\ H_2O$$

Así, la combinación de la síntesis del glucógeno más la degradación del glucógeno a lactato rinde de hecho sólo 1 ATP.

$$\text{glucosa} + ADP^{3-} + P_i^{2-} \rightarrow 2\ \text{lactato}^- + ATP^{4-} + H_2O + H^+$$

Sin embargo, la síntesis y la degradación del glucógeno se llevan a cabo en la célula en diferentes momentos. Por ejemplo, las fibras musculares blancas sintetizan glucógeno cuando están en reposo, esto es, cuando hay abundancia de glucosa y se necesita menos ATP para la contracción muscular. El glucógeno se utiliza posteriormente en períodos de esfuerzo. Aunque sobre esta base el almacenamiento de glucógeno no es un proceso muy eficiente, sí proporciona a las células una reserva de combustible que puede movilizarse rápida y eficientemente.

Aspectos especiales de la degradación y síntesis del glucógeno

¿Por qué almacenar glucosa en forma de glucógeno?

Dado que el glucógeno es una reserva tan buena de combustible, es obvia la razón por la que sintetizamos y almacenamos glucógeno en el hígado y en el músculo. Pero, ¿por qué no almacenar nuestro exceso de calorías de glucosa enteramente como grasa en lugar de glucógeno? La respuesta es, como mínimo, triple: (1) almacenamos grasa, pero la grasa no se puede movilizar en el músculo tan rápidamente como el glucógeno; (2) la grasa no se puede utilizar como fuente de energía en ausencia de oxígeno; y (3) la grasa no puede ser convertida en glucosa con el fin de mantener los niveles sanguíneos de glucosa requeridos por el cerebro. ¿Por qué no bombear simplemente glucosa dentro de las células y almacenarla como glucosa libre hasta que se necesite? ¿Por qué derrochar tanto ATP haciendo un polímero a partir de la glucosa? El problema es que la glucosa es osmóticamente activa. Costaría ATP "bombear" glucosa dentro de la célula en contra de un gradiente de concentración, y la glucosa tendría que alcanzar concentraciones del orden de 400 mM en las células hepáticas para igualar la "reserva de glucosa" proporcionada por los niveles usuales de glucógeno hepático. A menos que se equilibrase con el movimiento hacia el exterior de algún otro compuesto osmóticamente activo, la acumulación de tales concentraciones de glucosa produciría la captación de una cantidad considerable de agua y la lisis osmótica de la célula. Suponiendo que la masa molecular de una molécula de glucógeno es del orden de 10^7 Da, 400 mM de glucosa se almacenan en efecto a una concentración de glucógeno intracelular de 0,01 μM. El almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno no crea, por tanto, ningún problema de presión osmótica para la célula.

La glucogenina es necesaria como cebador de la síntesis de glucógeno

Al igual que en la síntesis de DNA, es necesario un **cebador** para la síntesis del glucógeno. Sin embargo, no se requiere un molde. El propio glucógeno es el cebador habitual, es decir, que la síntesis de glucógeno tiene normalmente lugar mediante adición de unidades glucosilo a las moléculas "núcleo" del glucógeno, que están casi invariablemente presentes en la célula. El exterior de la molécula de glucógeno se elimina y se resintetiza mucho más rápidamente que el núcleo interno. El glucógeno dentro de una célula es frecuentemente podado por la acción combinada de la glucógeno fosforilasa y el enzima desramificante, pero raramente es completamente eliminado antes de que la glucógeno sintasa y el enzima ramificante reconstruyan la molécula. Esto hace plantear la pregunta de por qué el glucógeno es una molécula ramificada con sólo un comienzo real (el extremo reductor) y muchas ramas que terminan con unidades glucosilo no reductoras. La respuesta es que esto proporciona numerosos puntos de ataque a la glucógeno fosforilasa en una molécula de glucógeno madura, a la vez que proporciona el mismo número de puntos para que la glucógeno sintasa añada una unidad glucosilo. Si las células sintetizasen α-amilosa, esto es, un polímero de glucosa no ramificado, sólo habría un extremo no reductor por molécula. El resultado de ello sería que tanto la degradación como la síntesis del glucógeno serían, ciertamente, procesos mucho más lentos. De hecho, la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa se encuentran normalmente en una célula en estrecha asociación con gránulos de glucógeno. Estando situadas en las ramas del árbol de glu-

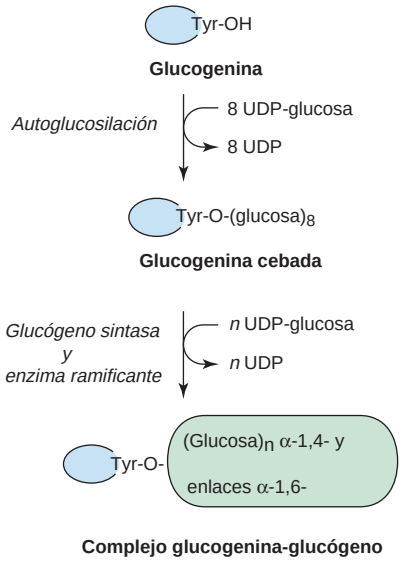


FIGURA 14.56
La glucogenina proporciona un cebador para la síntesis del glucógeno mediante la glucógeno sintasa.
Tyr hace referencia a un residuo de tirosina de la glucogenina.

cógeno, ambos enzimas tienen fácil acceso a una multitud de azúcares no reductores situados en los extremos de las ramas. ¿Por qué es necesario un cebador para la síntesis del glucógeno? Porque resulta imposible iniciar la síntesis de glucógeno a partir de una simple molécula de glucosa como aceptor del residuo glucosilo activado de la UDP-glucosa. La glucógeno sintasa tiene una K_m muy baja para las moléculas de glucógeno muy grandes y por tanto añade fácilmente residuos glucosilo para hacerlas aun mayores. Sin embargo, la K_m se hace cada vez mayor, a medida que las moléculas de glucógeno son menores. Este fenómeno es tan pronunciado que la glucosa, a su concentración fisiológica, no puede actuar como cebador. Esto condujo en su momento a la noción de que el glucógeno debería ser inmortal, esto es, que algo de glucógeno tenía que pasar de una generación de células a la siguiente para que se pudiera sintetizar el glucógeno. Sin embargo, se sabe actualmente que existe un polipéptido de 332 aminoácidos, llamado **glucogenina**, que actúa de cebador en la síntesis del glucógeno. La glucogenina es un enzima autoglucosilante que utiliza la UDP-glucosa para unir la glucosa a uno de sus propios residuos de tirosina (Figura 14.56). La glucogenina glucosilada sirve entonces de cebador en la síntesis del glucógeno. Lamentablemente, el glucógeno no es inmortal.

El glucógeno limita su propia síntesis

Si la glucógeno sintasa se hace más eficiente a medida que la molécula de glucógeno se hace más grande, ¿cómo se restringe la síntesis de esta bola de azúcar? Las células grasas tienen una capacidad casi ilimitada de atestarse de grasa (por otro lado, no tienen otra cosa que hacer). Las células musculares participan en actividades mecánicas, y las células del hígado llevan a cabo, además de la síntesis de glucógeno, muchos procesos. Aun ante un exceso de glucosa, ha de existir un límite a la acumulación intracelular de glucógeno. El propio glucógeno inhibe la glucógeno sintasa a través de un mecanismo que se analiza en una sección posterior (véase p. 654).

La síntesis y degradación del glucógeno son rutas altamente reguladas

La glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa son los enzimas reguladores de la síntesis y de la degradación del glucógeno respectivamente. Ambos catalizan reacciones desplazadas del equilibrio, y ambos están sujetos a control por efectores alostéricos y modificación covalente.

Regulación de la glucógeno fosforilasa

La **glucógeno fosforilasa** está sujeta a activación alostérica por **AMP** e inhibición alostérica por **glucosa** y **ATP** (Figura 14.57). El control por estos efectores se integra en un control muy elaborado que se ejerce a través de la modificación covalente. La fosforilasa existe en una forma *a*, que es activa, y una forma *b* que tiene muy poca actividad. Estas formas del enzima se interconvierten por acción de la **fosforilasa quinasa** y de la **fosfoproteína fosfatasa** (Figura 14.57). Un cambio conformacional provocado por la fosforilación transforma el enzima, pasándolo a un estado catalíticamente más activo. Aunque la fosforilasa *b* posee una actividad catalítica baja ésta puede ser aumentada poderosamente por el AMP. Sin embargo, este efector alostérico apenas incrementa la actividad de la forma ya activa, fosforilasa *a*. Por tanto, el mecanismo de modificación covalente puede ser evitado en favor del mecanismo alostérico y viceversa.

La **fosforilasa quinasa** es la responsable de la fosforilación y activación de la fosforilasa (Figura 14.57). Además, la propia fosforilasa quinasa está también sujeta a regulación por un mecanismo de fosforilación–desfosforilación cíclico. La proteína quinasa A fosforila y activa a la fosforilasa quinasa, y la fosfoproteína fosfatasa, a su vez, desfosforila e inactiva la fosforilasa quinasa. La fosforilasa quinasa es un gran complejo enzimático ($1{,}3 \times 10^6$ Da), compuesto de cuatro subunidades, con cuatro moléculas de cada subunidad en el complejo ($\alpha_4\beta_4\gamma_4\delta_4$). La actividad catalítica se halla en la subunidad γ; las subunidades α, β y δ ejercen el control regulador. Las subunidades fosforiladas en la transición de la forma inactiva (*b*) a la forma activa (*a*) del enzima son las α y β. La proteína quinasa A solamente puede ejercer su efecto sobre la fosforilasa gracias a su capacidad de fosforilar y activar la fosforilasa quinasa. Por tanto, la activación de la fosforilasa en respuesta a señales a través del cAMP requiere un sistema bicíclico (Figura 14.57).

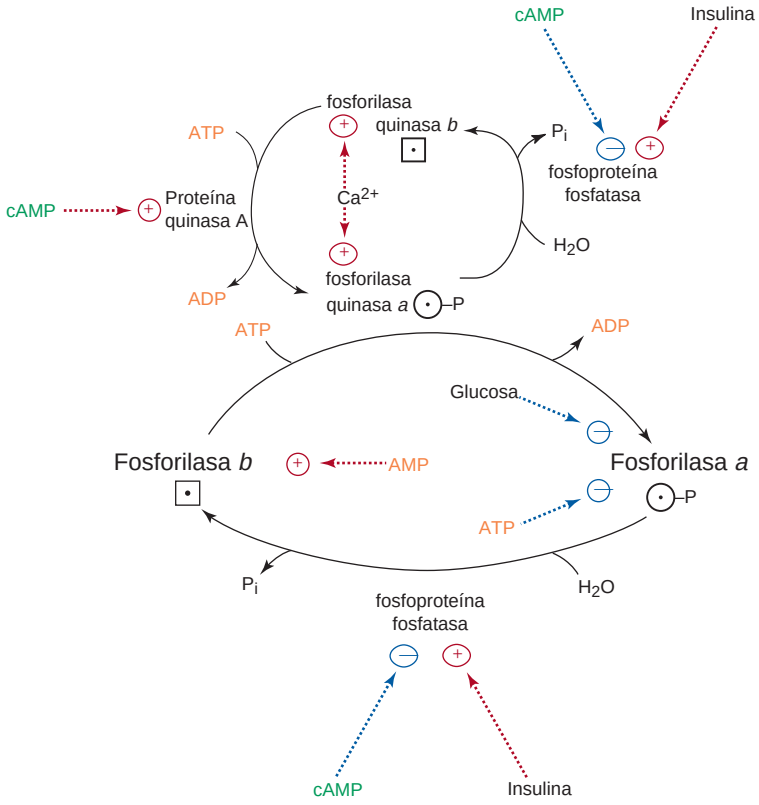


FIGURA 14.57
Regulación de la glucógeno fosforilasa por modificación covalente.
La fosforilación convierte a la glucógeno fosforilasa y a la fosforilasa quinasa de sus formas inactivas *b* a sus formas activas *a*.

La subunidad δ de la fosforilasa quinasa también desempeña un importante papel regulador. La subunidad δ es una proteína reguladora fijadora de Ca^{2+}, denominada **calmodulina**. La calmodulina no es exclusiva de la fosforilasa quinasa, ya que se encuentra como molécula libre en las células, así como unida a otros complejos enzimáticos. La calmodulina actúa como receptor de Ca^{2+} en la célula, respondiendo a cambios en la concentración intracelular de este ion y afectando a la actividad relativa de una serie de sistemas enzimáticos. La unión de Ca^{2+} a la subunidad calmodulina de la fosforilasa quinasa cambia la conformación del complejo, haciendo que el enzima sea más activo respecto a la fosforilación de la fosforilasa. Como se muestra en la Figura 14.57, el Ca^{2+} es un activador tanto de la fosforilasa quinasa *a* como de la fosforilasa quinasa *b*. La activición máxima de la fosforilasa quinasa requiere tanto la fosforilación de residuos de serina específicos del enzima como la interacción del Ca^{2+} con la subunidad calmodulina del enzima. Este es uno de los mecanismos por los cuales el Ca^{2+} actúa como un importante "segundo mensajero" de la acción hormonal, tal como se verá más adelante.

La activación de la fosforilasa quinasa por fosforilación y Ca^{2+} ejerce un efecto sustancial en la actividad de la glucógeno fosforilasa. Es igualmente obvio, sin embargo, que la inactivación de la fosfoproteína fosfatasa que modula los estados de fosforilación tanto de la fosforilasa quinasa como de la glucógeno fosforilasa puede conseguir el mismo efecto (Figura 14.57). El control definitivo de la glucógeno fosforilasa vendría dado por la regulación recíproca de las actividades de la **fosfoproteína fosfatasa** y la fosforilasa quinasa. Aunque se desconocen todavía muchos detalles, hay pruebas de que la fosfoproteína fosfatasa y la fosforilasa quinasa son controladas de forma recíproca. La regulación de la actividad de la fosfoproteína fosfatasa está ligada al cAMP (véase p. 655). El aspecto más importante de la Figura 14.57 es que las hormonas que hacen aumentar los niveles de cAMP, tales como el glucagón y la adrenalina, promueven la activación de la glucógeno fosforilasa a través de la señalización de la activación de la fosforilasa quinasa y la inactivación de la fosfoproteína fosfatasa. Por otra parte, la insulina, a través de una cascada de señalización a través de quinasas, ejerce el efecto opuesto en la fosforilasa, al promover la activación de la fosfoproteína fosfatasa.

La cascada que regula la glucógeno fosforilasa amplifica una señal pequeña produciendo un efecto muy grande

Existe una buena razón para la existencia de un mecanismo de control bicíclico de la fosforilación de la glucógeno fosforilasa. Éste proporciona un mecanismo de **amplificación** tremenda a partir de una señal inicial muy pequeña. La activación de la **adenilil ciclasa** por una molécula de adrenalina, conduce a la formación de muchas moléculas de cAMP. Cada una de ellas activa a una molécula de proteína quinasa A, la cual, a su vez, puede activar muchas moléculas de fosforilasa quinasa, así como inhibir muchas moléculas de fosfoproteína fosfatasa. La fosforilasa quinasa, a su vez, fosforila muchas moléculas de glucógeno fosforilasa y ésta, por fin, cataliza la fosforólisis de multitud de enlaces glucosídicos en el glucógeno. Por tanto, este mecanismo suministra un elaborado sistema de amplificación, en el cual una señal provocada por unas pocas moléculas de hormona es amplificada hasta la producción de un enorme número de moléculas de glucosa 1-fosfato. ¡Si cada uno de los pasos representa, pongamos por caso, un factor de amplificación de 100, el conjunto de los cuatro pasos provocaría una amplificación de 100 millones! Este sistema es tan rápido debido en gran parte al mecanismo de amplificación que todo el glucógeno almacenado en las fibras musculares blancas puede ser completamente movilizado en unos pocos segundos.

Regulación de la glucógeno sintasa

La **glucógeno sintasa** debe ser activa durante la síntesis del glucógeno e inactiva durante su degradación. La combinación de las reacciones catalizadas por la glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa, glucosa 1-fosfato uridilil transferasa y nucleósido difosfato quinasa da como resultado un ciclo inútil con la reacción global: ATP + $H_2O \rightarrow$ ADP + P_i. De ahí que sea necesario que la glucógeno sintasa esté desconectada cuando está conectada la glucógeno fosforilasa y viceversa.

En determinadas circunstancias, la activación de la glucógeno sintasa por la glucosa 6-fosfato, un efector alostérico, puede tener un significado fisiológico (Figura 14.58). Sin embargo, al igual que con la glucógeno fosforilasa, este modo de control está integrado con la regulación mediante modulación covalente (Figura 14.58). La glucógeno sintasa existe en dos formas. Una se designa **forma D**, porque depende para su actividad de la presencia de G6P. La otra se designa **forma I**, porque su actividad es independiente de la G6P. La forma D corresponde a la forma *b* o forma inactiva del enzima, mientras que la I corresponde a la forma *a* del enzima o forma activa. La fosforilación de la glucógeno sintasa puede ser catalizada por varias quinasas distintas, las cuales están, a su vez, reguladas por diferentes segundos mensajeros de la acción hormonal, entre los que se cuentan el cAMP, Ca^{2+}, diacilglicerol y quizás algunos mecanismos de señalización que aún no han sido identificados. Cualquiera de las proteína quinasas mostradas en la Figura 14.58 es capaz de catalizar la fosforilación y contribuir a la inactivación de la glucógeno sintasa. Aunque la glucógeno sintasa es un tetrámero simple (α_4) constituido por un único tipo de subunidad (masa molecular 85 000 Da), esta subunidad puede ser fosforilada al menos en nueve residuos de serina diferentes. Se han identificado once proteína quinasas diferentes capaces de fosforilar la glucógeno sintasa. Esto contrasta fuertemente con la glucógeno fosforilasa, que es regulada por fosforilación en un único sitio por una quinasa específica.

El cAMP es una señal intracelular extremadamente importante para el control recíproco de la glucógeno sintasa (Figura 14.58) y de la glucógeno fosforilasa (Figura 14.57). Un incremento de cAMP provoca la activación de la glucógeno fosforilasa, así como la inactivación de la glucógeno sintasa a través de la activación de la proteína quinasa A y de la inhibición de la fosfoproteína fosfatasa. De forma similar, el Ca^{2+} puede influir en el estado de fosforilación de ambos enzimas, y regular recíprocamente su actividad a través de sus efectos sobre la fosforilasa quinasa. Se han identificado dos proteína quinasas independientes de cAMP y activadas por Ca^{2+}, que podrían tener también importancia fisiológica. Una de ellas es la llamada **proteína quinasa dependiente de calmodulina**, y la otra una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípido (**proteína quinasa C**). Ambos enzimas fosforilan la glucógeno sintasa, pero ninguno de ellos puede fosforilar la glucógeno fosforilasa. La proteína quinasa C expresa su actividad completa en presencia de fosfolípidos, **diacilglicerol** y Ca^{2+}. La proteína quinasa C ha despertado un considerable interés, ya que se ha descubierto que unos agentes tumorígenos denominados **ésteres de for-**

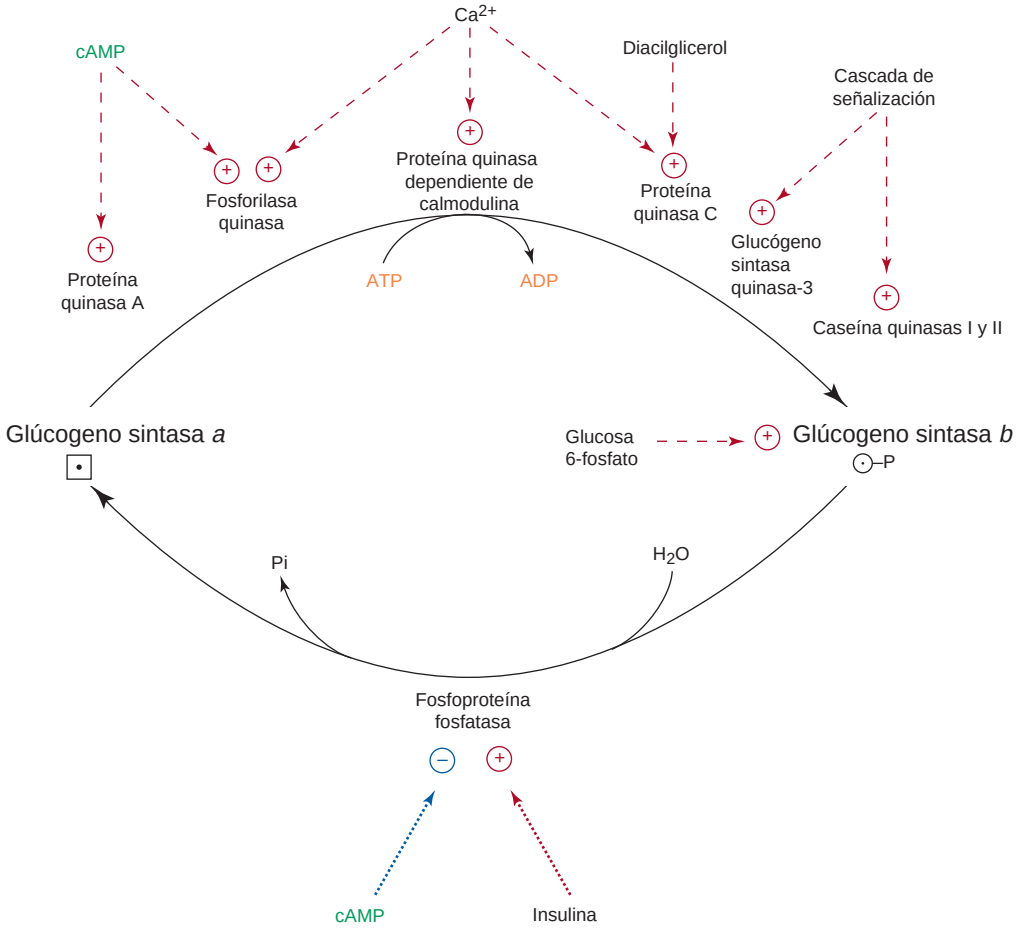


FIGURA 14.58
Regulación de la glucógeno sintasa por modificación covalente.
La fosforilación convierte a la glucógeno sintasa de su forma activa *a* a la inactiva *b*.

bol mimetizan la acción del diacilglicerol como activadores de este enzima. El diacilglicerol es considerado un importante "segundo mensajero" de la acción hormonal que actuaría a través de la proteína quinasa C regulando numerosos procesos celulares (véase p. 930).

La **glucógeno sintasa quinasa-3**, la caseína quinasa I, y la caseína quinasa II también fosforilan la glucógeno sintasa. El Ca^{2+} y el cAMP no ejercen ningún tipo de control sobre estas quinasas, pero es probable que existan mecanismos especiales para su regulación. Esta puede ser la solución a algunas cuestiones aún sin resolver tales como el mecanismo de acción de la **insulina** y de otras hormonas. *Desde luego, pruebas recientes sugieren que la insulina puede señalizar la inactivación de la glucógeno sintasa quinasa-3, acción que permitiría que la activación de la glucógeno sintasa tuviese lugar mediante desfosforilación por la fosfoproteína fosfatasa.*

La fosfoproteína fosfatasa que convierte de nuevo la glucógeno sintasa *b* en glucógeno sintasa *a* (Figura 14.58) es regulada de forma análoga a la descrita para la regulación de la glucógeno fosforilasa (Figura 14.57). El AMP cíclico promueve la inactivación, mientras que la insulina activa la glucógeno sintasa a través de efectos opuestos en la actividad de la fosfoproteína fosfatasa.

Regulación de las fosfoproteína fosfatasas

Se están estudiando actualmente varias **fosfoproteína fosfatasas** que eliminan específicamente fosfato de residuos de serina de proteínas. En general, las fosfoproteína fosfatasas están formadas por subunidades catalíticas asociadas con varias subunidades reguladoras diferentes, que controlan la actividad de la subunidad catalítica, determinan con qué sustrato o sustratos puede interaccionar y desfosforilar la subunidad catalítica, y dirigen la asociación de la subunidad catalítica con alguna estructura o componente de la célula específico. Una de estas proteínas reguladoras importante para el metabolismo del glucógeno es la denominada **subunidad G**, indicando que es una **proteína que se une al glucógeno**. La subunidad

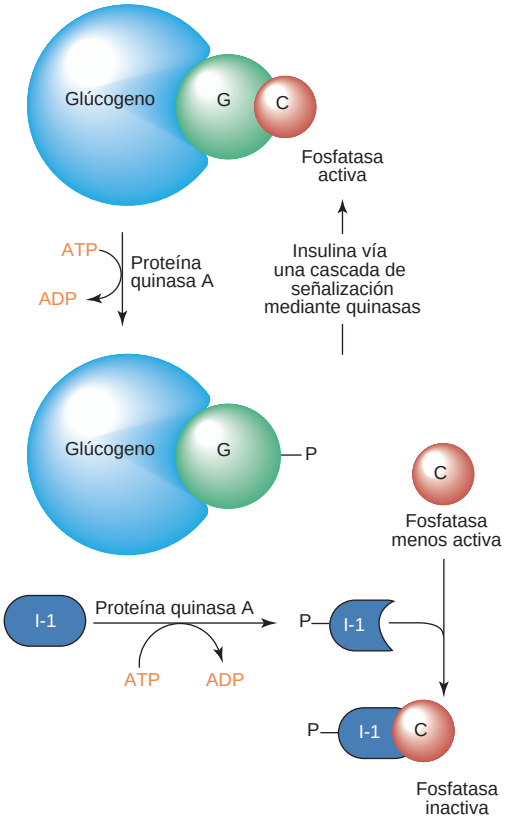


FIGURA 14.59
Mecanismo de regulación de una fosfatasa que se une al glucógeno.
La subunidad G de unión a glucógeno, se une directamente a éste; la subunidad catalítica C de la fosfoproteína fosfatasa se une al glucógeno a través de la subunidad G; el inhibidor 1 fosforilado (I-1) se une a la subunidad catalítica libre.

G se une tanto al glucógeno como a una subunidad catalítica fosfatasa (Figura 14.59). Esta asociación multiplica por diez la actividad de la fosfatasa hacia la glucógeno sintasa y a la glucógeno fosforilasa y, por tanto, promueve su desfosforilación. No obstante, la fosforilación de la subunidad G por la proteína quinasa A tiene como resultado la liberación de la subunidad catalítica de la fosfatasa, que pierde una parte de su actividad. La interacción de la subunidad catalítica libre con otra proteína reguladora (denominada inhibidor 1) causa entonces una mayor inhibición de la actividad fosfatasa. La inhibición efectiva de la actividad fosfatasa residual de la subunidad catalítica requiere la fosforilación del inhibidor 1 por la proteína quinasa A, creando así otra unión con las hormonas que hacen aumentar los niveles de cAMP. La insulina tiene efectos opuestos a los del cAMP, esto es, la insulina promueve la activación de la subunidad catalítica de la fosfoproteína fosfatasa. Esto involucra presumiblemente la inversión de los pasos promovidos por el cAMP, pero los detalles de cómo se consigue esto no se han establecido todavía.

Control por efector del metabolismo del glucógeno

Se ha demostrado que ciertos músculos en condiciones anaeróbicas movilizan rápidamente sus depósitos de glucógeno sin conversión marcada de fosforilasa *b* a fosforilasa *a* ni glucógeno sintasa *a* a glucógeno sintasa *b*. Probablemente lo consiguen por control por efector, en el que los niveles de ATP disminuyen, lo que produce una inhibición menor de la fosforilasa; los niveles de glucosa 6-fosfato disminuyen por lo que hay menos activación de la glucógeno sintasa; y los niveles de AMP aumentan, dando así lugar a la activación de la fosforilasa. Esto permite que el músculo, al utilizar el ATP producido por la glucólisis de la glucosa 6-fosfato obtenida del glucógeno, continúe trabajando, al menos durante un período corto de tiempo.

También, por medio de estudios en una cepa especial de ratones que presentan un déficit de fosforilasa quinasa muscular, se han obtenido pruebas de que el control por efector puede ser adecuado. La fosforilasa *b* del músculo de tales ratones no se puede convertir en fosforilasa *a*. Sin embargo, el ejercicio intenso de estos ratones da lugar a la desaparición del glucógeno muscular, probablemente a causa de la estimulación de la fosforilasa *b* mediante efectores.

El glucógeno controla por retroinhibición su propia síntesis

El glucógeno ejerce un retrocontrol sobre su propia síntesis. La proporción de glucógeno sintasa en la forma activa *a* disminuye a medida que el glucógeno se acumula en un tejido determinado. No se conoce bien el mecanismo, pero el glucógeno quizá pueda hacer que la forma *a* de la glucógeno sintasa sea un mejor sustrato para alguna de las proteína quinasas, o, alternativamente, el glucógeno podría inhibir la desfosforilación de la glucógeno sintasa *b* por la fosfoproteína fosfatasa. Cualquiera de estos mecanismos podría explicar el desplazamiento del estado estacionario en favor de la glucógeno sintasa *b*, que tiene lugar en respuesta a la acumulación de glucógeno.

La fosforilasa a *funciona como un "receptor de glucosa" en el hígado*

El consumo de una comida rica en glúcidos provoca un aumento de glucosa en la sangre y en el hígado, lo que es una señal para que este último tejido incremente la síntesis de glucógeno. El mecanismo implica la estimulación por glucosa de la liberación de insulina por parte del páncreas, y los efectos consiguientes que esta hormona ejerce en la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa hepáticas. Sin embargo, parece que también son importantes en el hígado otros mecanismos independientes de las hormonas (Figura 14.60). Probablemente es importante la inhibición directa de la fosforilasa *a* por la glucosa. La unión de la glucosa a la fosforilasa hace que la forma *a* de ésta sea un mejor sustrato para la desfosforilación por parte de la fosfoproteína fosfatasa. Por tanto, la fosforilasa *a* funciona como un **receptor de glucosa** en el hígado. La unión de la glucosa a la fosforilasa *a* promueve la inactivación de ésta, con el resultado final de la inhibición por glucosa de la degradación del glucógeno. Este control de retroinhibición (*negative feedback*) de la glucogenólisis por la glucosa no promueve necesariamente la síntesis de glucógeno. Sin embargo, existen resultados experimentales que indican que la fosforilasa *a* es un inhibidor de la desfosforilación de la glucógeno sintasa *b* por la fosfoproteína fosfatasa. Esta inhibición se pierde cuando la fosforilasa *a* se convierte en la forma *b* (Figura 14.60). Dicho de otro modo, la fosfoproteína fosfatasa puede prestar su atención a la glucógeno sintasa *b* solamente después de la desfosforilación de la fosforilasa *a*. Como consecuencia de la interacción de la glucosa con la fosforilasa *a*, la fosforilasa se inactiva, al tiempo que la glucógeno sintasa se activa, con lo que el hígado sintetiza glucógeno en vez de degradarlo. La fosforilasa *a* puede funcionar como "receptor de glucosa" en el hígado porque la concentración de glucosa en este tejido siempre refleja la concentración de glucosa sanguínea. Esto no se da en los tejidos extrahepáticos. Las células del hígado poseen un sistema de transporte de glucosa de gran capacidad

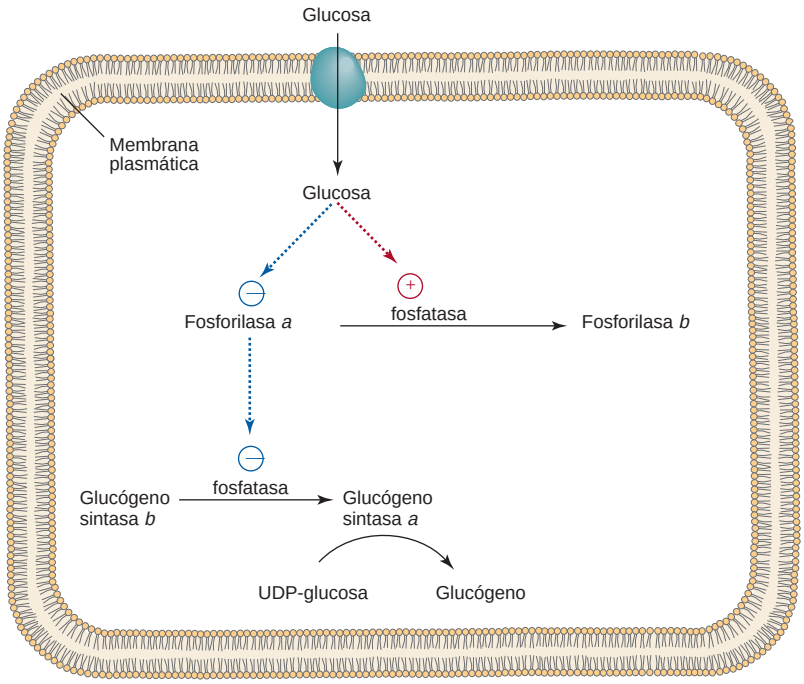


FIGURA 14.60
Visión global del mecanismo responsable de la estimulación de la síntesis del glucógeno en el hígado por glucosa.

(GLUT-2), y un enzima que fosforila glucosa (glucoquinasa) de elevada K_m. Las células de los tejidos extrahepáticos, por regla general, poseen sistemas de transporte y fosforilación de glucosa que mantienen la concentración intracelular de glucosa a niveles demasiado bajos para que la fosforilasa *a* actúe como "receptor de glucosa".

El glucagón estimula la degradación de glucógeno en el hígado

Las células **α** pancreáticas liberan glucagón a la sangre en respuesta a niveles bajos de glucosa sanguínea. Una de las misiones principales del glucagón durante los períodos de bajo aporte alimenticio (ayuno o inanición) es movilizar el glucógeno hepático, es decir, estimular la glucogenólisis, para asegurar un nivel adecuado de glucosa en la sangre, que pueda satisfacer las necesidades de los tejidos dependientes de glucosa. El glucagón circula en la sangre hasta que interacciona con receptores específicos tales como los que se encuentran en la membrana plasmática de las células del hígado (Figura 14.61). La unión de glucagón a estos receptores activa la adenilil ciclasa, lo cual dispara a su vez las cascadas que provocan la activación de la glucógeno fosforilasa y la inactivación de la glucógeno sintasa (Figuras 14.57 y 14.58, respectivamente). El glucagón también inhibe la glucólisis a nivel de la 6-fosfofructo-1-quinasa y de la piruvato quinasa, tal como se muestra en las Figuras 14.27 y 14.30, respectivamente. El resultado neto de estas acciones del glucagón, todas ellas con intervención del segundo mensajero cAMP y la modificación covalente, es un aumento muy rápido de los niveles de glucosa en sangre. Quizá pudiera esperarse una hiperglucemia, pero esto no ocurre porque la liberación de glucagón por parte del páncreas disminuye a medida que aumenta la glucosa en la sangre.

La adrenalina estimula la degradación del glucógeno en el hígado

La adrenalina es liberada a la sangre por las **células cromafines** de la médula adrenal en respuesta a situaciones de estrés. Esta hormona prepara el cuerpo para la huida o la lucha.

La unión de la adrenalina a receptores **β**-adrenérgicos de la membrana plasmática de las células del hígado, activa la adenilil ciclasa (Figura 14.61). El incremento resultante de cAMP tiene el mismo efecto que el provocado por el glucagón, esto es, la activación de la glucogenólisis y la inhibición de la glucogenogénesis y la glucólisis para maximizar la liberación de glucosa por el hígado. Además, la interacción de la adrenalina con el **receptor α-adrenérgico** de la membrana plasmática provoca la formación de **inositol 1,4,5-trisfosfato** (IP_3) y **diacilglicerol** (Figura 14.62 y p. 930).

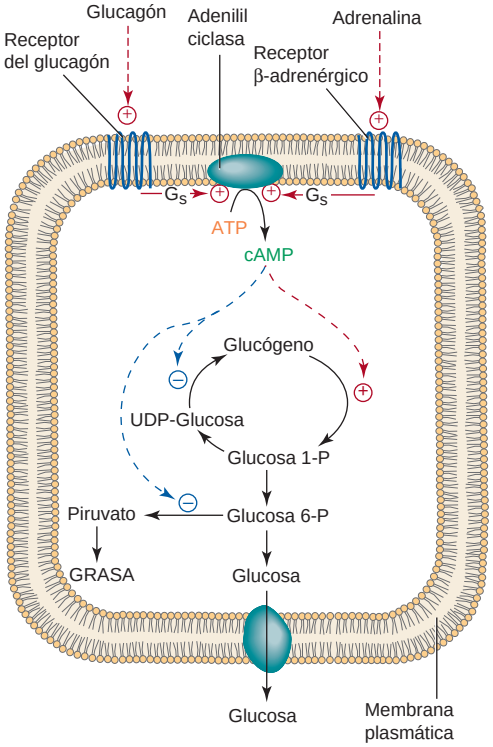


FIGURA 14.61
En el hígado, el cAMP interviene en la estimulación de la glucogenólisis hepática por el glucagón y β-agonistas (adrenalina).
Véase los pies de las Figuras 14.19 y 14.25.

Estos compuestos son segundos mensajeros, producidos en la membrana plasmática por acción de una fosfolipasa C sobre el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (Figura 14.63). El inositol 1,4,5-trisfosfato estimula la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (Figura 14.62). Como ya se comentó (Figura 14.57), el aumento de Ca^{2+} activa la fosforilasa quinasa, la cual, a su vez, hace lo propio con la glucógeno fosforilasa. De la misma forma (Figura 14.58), la activación mediante Ca^{2+} de la fosforilasa quinasa, de la proteína quinasa dependiente de calmodulina y de la proteína quinasa C, así como la activación de la proteína quinasa C mediante diacilglicerol pueden desempeñar un papel importante en la inactivación de la glucógeno sintasa.

Una consecuencia principal de la acción de la adrenalina sobre el hígado es el aumento de la velocidad de liberación de glucosa a la sangre. Esto permite que los tejidos a los que se acude para combatir la situación de estrés, que es lo que provoca la liberación de adrenalina de la médula adrenal, dispongan de mayor cantidad de glucosa en la sangre.

La adrenalina estimula la degradación de glucógeno en el corazón y el músculo esquelético

La adrenalina también estimula la degradación de glucógeno en el corazón y en el músculo esquelético. El AMP cíclico, producido en respuesta a la estimulación de la adenilil ciclasa por la adrenalina vía los receptores **β-adrenérgicos** (Figura 14.64), desencadena simultáneamente la activación de la glucógeno fosforilasa y la inactivación de la glucógeno sintasa por los mecanismos esquematizados en las Figuras 14.57 y 14.58, respectivamente. Sin embargo, en estos tejidos, ello no provoca la liberación de glucosa a la sangre. El músculo cardíaco y el músculo esquelético carecen de glucosa 6-fosfatasa, por lo que en estos tejidos el cAMP estimula la glucólisis (Figura 14.28). Por tanto, el papel de la adrenalina en el metabolismo del glucógeno en los músculos cardíaco y esquelético es proporcionar más glucosa 6-fosfato disponible para la glucólisis. El ATP generado por la glucólisis se utiliza para atender la demanda metabólica impuesta a estos músculos para poder hacer frente a la situación de estrés que provocó la liberación de adrenalina.

Control neural de la degradación de glucógeno en el músculo esquelético

En la excitación nerviosa de la actividad muscular intervienen cambios en la concentración **intracelular de Ca^{2+}** (Figura 14.65). El impulso nervioso provoca la **despolarización de la membrana** lo que, a su vez, origina la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático al sarcoplasma de las células musculares. Esta liberación de Ca^{2+} provoca la contracción del músculo, mientras que su reacumulación en el retículo sarcoplasmático causa la relajación del mismo. La misma variación en la concentración de Ca^{2+} (de 10^{-8} a 10^{-6} M) que provoca la contracción del músculo afecta también en gran medida a la actividad de la fosforilasa quinasa.

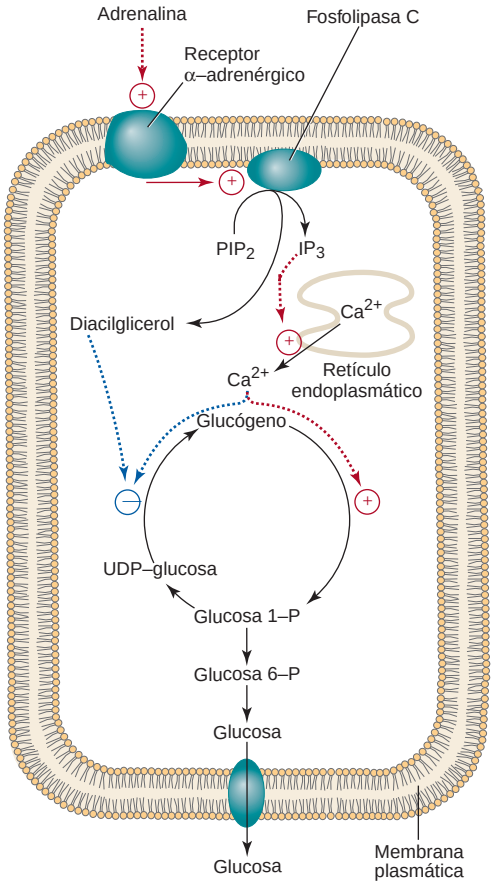


FIGURA 14.62
El inositol trisfosfato (IP_3) y el Ca^{2+} intervienen en la estimulación de la glucogenólisis hepática por α-agonistas. El receptor α-adrenérgico y el transportador de glucosa son componentes intrínsecos de la membrana plasmática. Aunque no esté indicado, el fosfatidilnositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) es también un componente de la membrana plasmática.

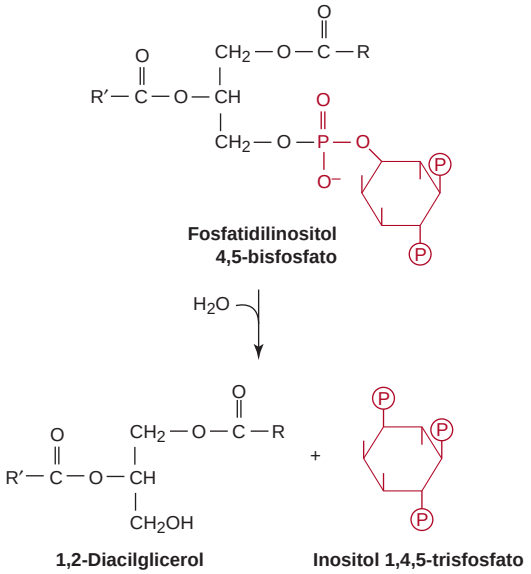


FIGURA 14.63
La fosfolipasa C rompe el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato produciendo 1,2-diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato.

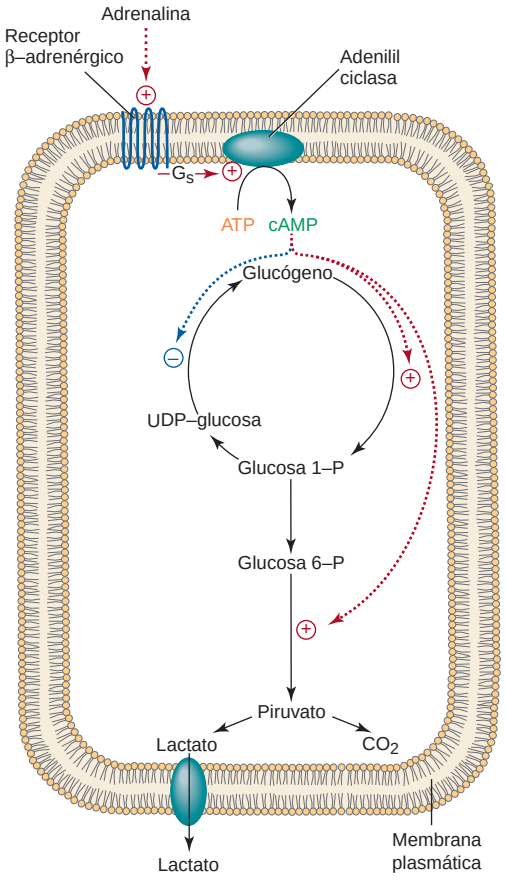


FIGURA 14.64
El AMP cíclico interviene en la estimulación de la glucogenólisis en el músculo por *β*-agonistas (adrenalina).
El receptor *β*-adrenérgico es un componente intrínseco de la membrana plasmática que actúa estimulando la adenilil ciclasa a través de una proteína G estimuladora (G_s).

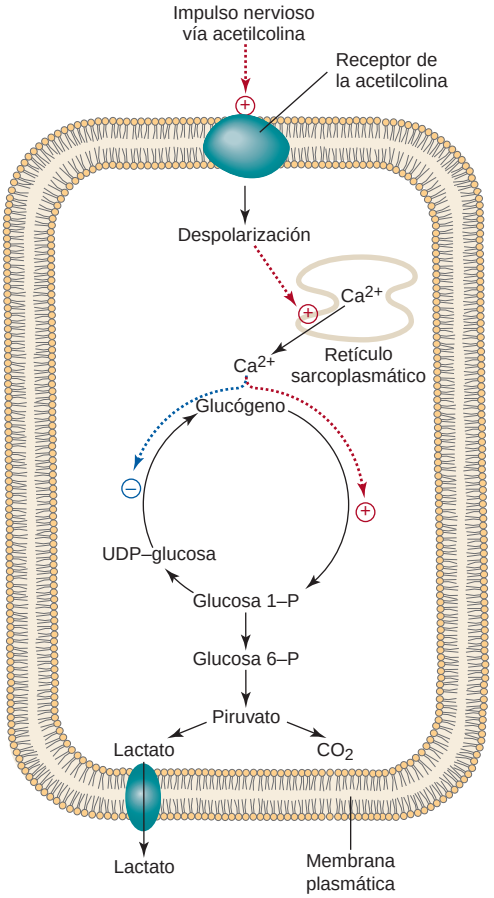


FIGURA 14.65
El Ca^{2+} interviene en la estimulación de la glucogenólisis en el músculo por excitación nerviosa.

A medida que aumenta la concentración de Ca^{2+}, la actividad muscular se incrementa, y con ella la necesidad de ATP. La activación de la fosforilasa quinasa por Ca^{2+} conlleva la activación de la glucógeno fosforilasa, y quizás la inactivación de la glucógeno sintasa. El resultado final es que una mayor cantidad de glucógeno se convierte en glucosa 6-fosfato, con lo que se puede producir más ATP para atender la mayor demanda energética de la contracción muscular.

La insulina estimula la síntesis de glucógeno en el músculo y en el hígado

Cuando la glucosa en sangre aumenta, las células ***β*** del páncreas liberan insulina. Los receptores de la insulina, localizados sobre la membrana plasmática de las células sensibles a insulina, responden a la unión de la insulina induciendo una cascada de señalización que promueve la utilización de glucosa por estos tejidos (Figuras 14.66 y 14.67). Cuando el nivel de glucosa sanguíneo disminuye, el páncreas responde liberando menos insulina y más glucagón. Estas hormonas ejercen un efecto opuesto sobre la utilización de glucosa por el hígado, haciendo del páncreas un instrumento de ajuste fino que evita fluctuaciones peligrosas de la glucosa sanguínea.

La insulina aumenta la velocidad de utilización de glucosa, en parte promoviendo la glucogenogénesis e inhibiendo la glucogenólisis en el músculo (Figura 14.66) y en el hígado (Figura 14.67). Para conseguir estos efectos, es importante en el músculo, aunque no en el hígado, la estimulación por la insulina del transporte de glucosa a través de la membrana plasmática. Los hepatocitos poseen un **sistema de transporte de glucosa independiente de la insulina (GLUT-2)**, mientras que las células musculares y los adipocitos están equipados con un **sistema de transporte de glucosa (GLUT-4)**, que requiere de la presencia de insulina para alcanzar la máxima velocidad de captación de glucosa (véase p. 520). La insulina estimula el transporte de glucosa en los músculos y en el tejido adiposo mediante un aumento del número de proteínas GLUT-4 funcionales asociadas con la membrana plasmática. Esto se consigue

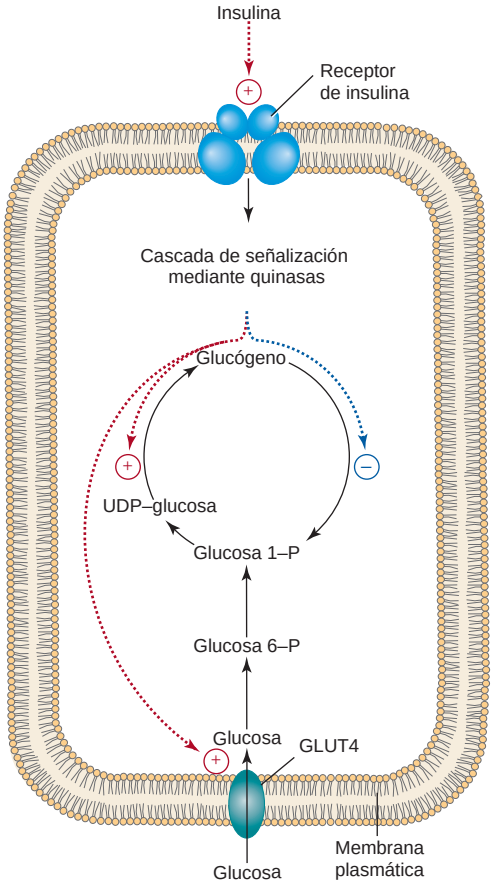


FIGURA 14.66
La insulina actúa a través de un receptor en la membrana plasmática, promoviendo la síntesis del glucógeno en el músculo.

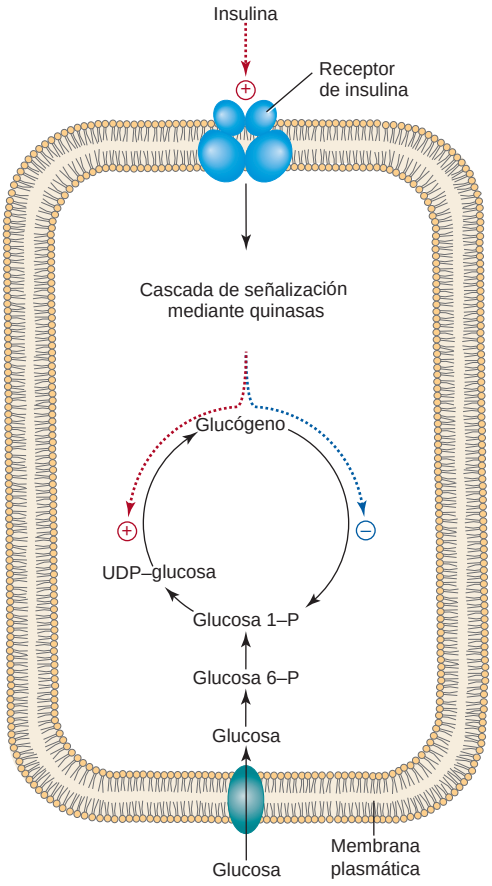


FIGURA 14.67
La insulina actúa a través de un receptor de la membrana plasmática para promover la síntesis de glucógeno en el hígado.

promoviendo la translocación a la membrana plasmática de GLUT-4 a partir de una reserva intracelular (véase Figura 14.6). La insulina promueve además en ambos tejidos la acumulación de glucógeno, al activar la glucógeno sintasa e inhibir la glucógeno fosforilasa, como se ha explicado anteriormente (Figuras 14.57 - 14.59).

BIBLIOGRAFÍA

Arion, W. J., Lange, A. J., Walls, H. E. y Ballas, L. M. Evidence for the participation of independent tanslocases for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose 6-phosphatase system. *J. Biol. Chem.* 225:10396, 1980.

Berridge, M. J. Review article: inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220:345, 1984.

Brooke, M. H. y Kaiser, K. K. The use and abuse of muscle histochemistry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 228:121, 1974.

Cheatham, B. y Kahn, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* 16:117, 1995.

Cohen, P. Dissection of the protein phosphorylation cascades involved in insulin and growth factor action. *Biochem. Soc. Trans.* 21:555, 1993.

DeFronzo, R. A. y Ferrannini, E. Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetes Metab. Reviews* 3:415, 1987.

DePaoli-Roach, A. A., Park, I.-K., Cerovsky, V., Csortos C., Durbin, S. D., Kuntz, M. J., Sitikov, A., Tang, P. M., Verin, A. y Zolnierowicz, S. Serine/ threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv. Enzyme Regul.*34:199, 1994.

Depre, C. Rider, M. H., and Hue L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* 258:277, 1998.

Exton, J. H. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes Metab. Rev.* 3:163, 1987.

Fell, D. *Understanding the Control of Metabolism.* London: Portland Press, 1997.

García, C. K., Goldstein, J. L., Pathak, R. K., Anderson, R. G. W. y Brown, M. S. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76:865, 1994.

Geelen, M. J. H., Harris, R. A., Beynen, A. C. y McCune, S. A. Short-term hormonal control of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 29:1006, 1980.

Gitzelmann, R., Steinmann, B. y Van den Berghe, G. Disorders of fructose metabolism. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, pp. 905–934.

Gould, G. W. y Holman, G. D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295:329, 1993.

Greene, H. L., Slonin, A. E. y Burr, I. M. Type I glycogen storage disease: A metabolic basis for advances in treatment. En: L. A. Barness (Ed.), *Advances in Pediatrics*, Vol. 26. Chicago: Year Book Publishers, 1979, p. 63.

Gurney, A. L., Park, E. A., Liu, J., Giralt, M., McGrane, M. M., Patel, Y. M., Crawford, D. R., Nizielski, S. E., Savon, S. y Hanson, R. W. Metabolic regulation of gene transcription. *J. Nutr.* 124:1533S, 1994.

Hallfrisch, J. Metabolic effets of dietary fructose. *FASEB J.* 4:2652, 1990.
Hanson, R. W. y Mehlman, M. A. (Eds.). *Gluconeogesis, Its Regulation in Mammalian Species*. New York: Wiley, 1976.
Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell* 80:225, 1995.
Isselbacher, K. J., Adams, R. D., Braundwald, E., Petersdorf, R. B. y Wilson, J. D. (Eds.). *Harrison's principles of internal medicine*, 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1980.
Lalli, E. y Sassone-Corsi, P. Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J. Biol. Chem.* 269:17359,1994.
Lieber, C. S. The metabolism of alcohol. *Sci. Am.* 234:25, 1976.
Lomako, J., Lomako, W. M. y Whelan, W. J. A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.* 2:3097, 1988.
Metzler, D. E. *Biochemistry, The Chemical Reactions of Living Cells*, New York, Academic Press, 1977.
Newsholme, E. A. y Leech, A. R. *Biochemistry for the Medical Sciences*. New York: Wiley, 1983.
Newsholme, E. A. y Start, C. *Regulation in Metabolism*. New York: Wiley, 1973.
Pilkis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J. y Lange, A. J. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 64:799, 1995.
Pilkis, S. J. y El-Maghrabi, M. R. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57:755, 1988.
Price, T. B., Rothman, D. L. y Shulman R. G. NMR of glycogen in exercise. *Proc. Nutr. Soc.* 58:851, 1999.
Roach, P. J., Skurat, A. V. y Harris, R. A. Regulation of glycogen metabolism. In L. S. Jefferson y A. D. Charrington (Eds.), *The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism: Handbook of Physiology.* New York: Oxford, 2001.
Roach, P. J. Hormonal control of glycogen metabolism. En: H. Rupp (Ed.), *Regulation of Heart Function: Basic Concepts and Clinical Applications*. New York: Thieme-Stratton, 1985.
Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. y Valle, D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
Stanley, C. A., Anday, E. K., Baker, L. y Delivoria-Papadopoulos, M. Metabolic fuel and hormone responses to fasting in newborn infants. *Pediatrics* 64:613, 1979.
Taylor, S. I., Diabetes mellitus. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, pp. 843–896.
van Schaftigen, E., Vandercammen, A., Detheux, M. y Davies, D. R. The regulatory protein of liver glucokinase. *Adv. Enzyme Regul.* 32:133, 1992.
Vaulont, S. y Kahn, A. Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* 8:28, 1994.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. La síntesis de ATP en la glucólisis está catalizada por:
   A. hexoquinasa.
   B. 6-fosfofructo-1-quinasa.
   C gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
   D. fosfoglicerato quinasa.
   E. ninguna de las anteriores.

2. Las reacciones irreversibles en la glucólisis incluyen las catalizadas por:
   A. fosfoglucosa isomerasa.
   B. 6-fosfofructo-1-quinasa.
   C. fructosa-bisfosfato aldolasa.
   D. gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
   E. fosfoglicerato quinasa.

3. En el citoplasma, el NAD^+ se puede regenerar si el NADH reacciona con cualquiera de los siguientes compuestos, EXCEPTO:
   A. piruvato.
   B dihidroxiacetona fosfato.
   C. oxalacetato.
   D. la flavina unida a la NADH deshidrogenasa.

4. La glucoquinasa:
   A. tiene una K_m bastante superior a las concentraciones normales de glucosa en sangre.
   B. se encuentra en el músculo.
   C. es inhibida por la glucosa 6-fosfato.
   D. es también conocida como proteína GLUT-2.
   E. posee actividad glucosa-6-fosfatasa además de actividad quinasa.

5. La 6-fosfofructo-1-quinasa puede ser inhibida por todos los siguientes factores EXCEPTO:
   A. el ATP a elevadas concentraciones.
   B. el citrato.
   C. el AMP.
   D. un pH bajo.
   E. la disminución de la concentración de fructosa 2,6-bifosfato.

6. ¿Cuál de las siguientes reacciones contribuye a la gluconeogénesis?:
   A. α-cetoglutarato + aspartato $\rightleftharpoons$ glutamato + oxalacetato.
   B. piruvato + ATP + HCO_3 $\rightleftharpoons$ oxalacetato + ADP + P_i + H^+
   C. acetil CoA + oxalacetato + H_2O $\rightleftharpoons$ citrato + CoA
   D. degradación de leucina.
   E. degradación de lisina.

7. En el ciclo de Cori:
   A. están implicados solamente tejidos con metabolismo aeróbico (es decir, mitocondrias y O_2).
   B. los compuestos de tres átomos de carbono que provienen de la glucólisis son convertidos en glucosa a expensas de la energía de la oxidación de los ácidos grasos.
   C. la glucosa es convertida a piruvato en los tejidos anaeróbicos, y este piruvato vuelve al hígado, donde es convertido en glucosa.
   D. se utiliza la misma cantidad de ATP en el hígado para sintetizar glucosa que es liberada durante la glucólisis, lo que conlleva un efecto neto nulo en el balance energético del organismo completo.
   E. el nitrógeno de la alanina debe ser convertido en urea, aumentando la cantidad de energía requerida por el proceso.

8. Entre los enzimas gluconeogénicos se encuentran todos los siguientes, EXCEPTO:
   A. la fructosa-1,6-bisfosfatasa.
   B. la glucosa-6-fosfatasa.
   C la fosfo*enol*piruvato carboxiquinasa.
   D. la fosfoglucomutasa.
   E. la piruvato carboxilasa.

9. Cuando aumenta el nivel de glucagón en la sangre, ¿cuál de las siguientes actividades enzimáticas hepáticas DISMINUYE?:
   A. la adenilil ciclasa.
   B. la proteína quinasa.
   C. la 6-fosfofructo-2-quinasa.
   D. la fructosa 1,6-bisfosfatasa.
   E la hexoquinasa.

10. La regulación por fosforilación–desfosforilación de la 6-fosfofructo-1-quinasa, la 6-fosfofructo-2-quinasa, y la piruvato quinasa es un mecanismo de regulación importante en:
    A. el cerebro.
    B. los eritrocitos.
    C. el intestino.
    D. el hígado.
    D. el músculo esquelético.

Preguntas 11 y 12: Los pacientes con la enfermedad de McArdle sufren calambres musculares dolorosos y no pueden realizar ejercicio vigoroso. Esta enfermedad, también llamada enfermedad de almacenamiento del glucógeno tipo V, está producida por la ausencia de fosforilasa muscular. A diferencia de los pacientes con la enfermedad de von Gierke (enfermedad de almacenamiento del glucógeno tipo I debida a una deficiencia de glucosa 6-fosfatasa), los pacientes de McArdle no sufren, típicamente, hipoglucemia en condiciones de ayuno. Los pacientes de von Gierke tienen acidemia láctica mientras que los pacientes de McArdle no tienen acidemia láctica después del ejercicio.

11. Los pacientes de McArdle:
    A. no consiguen sintetizar glucógeno adecuadamente
    B. no responden al glucagón de manera normal
    C. muestran un estado de glucólisis reducido durante el ejercicio
    D. tienen un ciclo de los ácidos tricarboxílicos deficiente
    E. tienen menos ácido láctico porque todo el lactato se convierte en piruvato

12. La glucosa 6-fosfatasa, que es deficiente en la enfermedad de von Gierke, es necesaria para la producción de glucosa sanguínea a partir de:
    A. glucógeno hepático
    B. fructosa
    C. cadenas carbonadas de los aminoácidos
    D. galactosa
    E. todos los anteriores

Preguntas 13 y 14: La hipertermia maligna es una anomalía genética en la que la exposición a ciertos agentes, especialmente el anestésico general de amplia utilización halotano, produce un incremento espectacular de la temperatura corporal, acidosis, hipercaliemia y rigidez muscular. La muerte sobreviene rápidamente si no se trata y puede ocurrir la primera vez que se anestesia a una persona susceptible. La enfermedad da lugar a una liberación inadecuada de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático del músculo. Muchos procesos productores de calor están estimulados de forma incontrolada por la liberación de Ca^{2+}, entre ellos la glucólisis y la glucogenólisis.

13. El Ca^{2+} aumenta la glucogenólisis mediante:
    A. activación de la fosforilasa quinasa *b*, incluso en ausencia de cAMP.
    B. fijación a la fosforilasa *b*.
    C. activación de la fosfoproteína fosfatasa.
    D. inhibición de la fosfoproteína fosfatasa.
    E. protección del cAMP de su degradación

14. La fosforilación-desfosforilación y la activación alostérica de los enzimas juegan papeles en la estimulación de la degradación del glucógeno. Todo lo siguiente da lugar a activación enzimática EXCEPTO:
    A. fosforilación de la fosforilasa quinasa.
    B. fijación de AMP a la fosforilasa *b*.
    C. fosforilación de la fosforilasa.
    D. fosforilación de la proteína quinasa A
    E. desfosforilación de la glucógeno sintasa.

Problemas

15. Si se fuerza una célula a que metabolice glucosa anaeróbicamente ¿a qué velocidad tendrá que funcionar la glucólisis para generar la misma cantidad de ATP que si se metabolizase la glucosa aeróbicamente?

16. El consumo de alcohol por un individuo malnutrido o por un individuo a continuación de un ejercicio extenuante puede producir hipoglucemia. ¿Qué reacciones son inhibidas por el consumo de alcohol?

RESPUESTAS

1. **D** La fosfoglicerato quinasa sintetiza ATP en la reacción directa. A y B utilizan ATP. C sintetiza 1,3-bisfosfoglicerato.
2. **B** la 6-fosfofructo-1-quinasa, forma ésteres de fosfato, que tienen enlaces de baja energía. A, C y D catalizan reacciones reversibles. E: la reacción de la fosfoglicerato quinasa es reversible porque el producto contiene un enlace de alta energía de tipo anhídrido de ácido carboxílico y ácido fosfórico.

3 **D** La flavina es mitocondrial. A puede ser convertido en lactato. B y C son los aceptores citoplasmáticos de las lanzaderas.

4. **A** La concentración de glucosa en sangre es ~5 mM. La K_m de la glucoquinasa es ~10 mM. B. La glucoquinasa es hepática y, a diferencia de la hexoquinasa muscular, no es inhibida por la glucosa-6-fosfato.

5 **C** El AMP es un regulador alostérico que disminuye la inhibición por ATP. B y D son probablemente reguladores de importancia fisiológica en el músculo, y E es crítica en el hígado.

6 **B** Esta reacción está en la ruta directa de conversión del piruvato a glucosa. A: Tanto el α-cetoglutarato como el oxalacetato dan lugar a glucosa; la interconversión entre ambos no aporta nada. C: En último término el citrato da lugar a oxalacetato, perdiendo en este proceso dos carbonos; aquí tampoco hay ganancia neta. D y E implican los dos aminoácidos que son estrictamente cetogénicos.

7 **B** El hígado obtiene la mayor parte de la energía requerida para la gluconeogénesis de la oxidación aeróbica de los ácidos grasos. A: El hígado es un órgano esencial en el ciclo de Cori; es aeróbico. C: En tejidos anaeróbicos el producto final de la glucólisis es el lactato; en tejidos aeróbicos es el piruvato, pero en ellos el piruvato será probablemente oxidado aeróbicamente. D: La gluconeogénesis requiere seis moléculas de ATP por cada molécula de glucosa sintetizada; la glucólisis proporciona dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa metabolizada. E: La alanina no forma parte del ciclo de Cori.

8 **D** La fosfoglucomutasa está en la ruta del metabolismo del glucógeno. A–C y E son los denominados enzimas gluconeogénicos; son los que sortean los pasos irreversibles de la glucólisis.

9 **C** A medida que aumenta el nivel de glucagón, A es activada, produciendo cAMP; éste activa B y B inactiva C. Los niveles bajos de fructosa 2,6-bisfosfato aumentan la actividad de D. E no es un enzima importante en el hígado. Su papel es desempeñado en el hígado por la glucoquinasa.

10 **D** La regulación de estos enzimas por fosforilación y desfosforilación controlada hormonalmente es de importancia central en el hígado. La 6-fosfofructo-2-quinasa está presente en otros tejidos pero no parece que su actividad cambie en respuesta a hormonas, excepto en el hígado. Otros enzimas en tejidos extrahe-

páticos, como los del metabolismo del glucógeno en el músculo, están bajo regulación por fosforilación–desfosforilación.

11 **C** Los músculos utilizan glucosa del glucógeno como sustrato principal de la glucólisis durante el ejercicio. La falta de fosforilasa impide la degradación del glucógeno. A: la fosforilasa no es necesaria para la síntesis del glucógeno, sólo para su degradación. B: los músculos no responden al glucagón; sí lo hace el hígado pero la fosforilasa hepática no está afectada por la enfermedad. D: el músculo utiliza ácidos grasos y cadenas carbonadas de aminoácidos vía ciclo de los ácidos tricarboxílicos. E: la formación de lactato está reducida porque la glucólisis no dispone de sustrato suficiente.

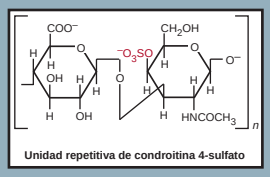
12 **E** para pasar a la sangre la glucosa debe estar libre, no fosforilada. A: el glucógeno se degrada a glucosa 1-fosfato que se convierte en glucosa 6-fosfato. B: la fructosa se metaboliza a dihidroxiacetona fosfato, que puede continuar a través de la glucólisis o volver a glucosa 6-fosfato, según sea el estado de la célula. C: las cadenas carbonadas de los aminoácidos son sustratos para la gluconeogénesis. D: la galactosa se convierte en último término en glucosa 1-fosfato vía UDP-galactosa.

13 **A** La subunidad γ de la fosforilasa quinasa es una proteína del tipo calmodulina. Tanto la forma *a* como la *b* del enzima se activan con Ca^{2+}. B, E: estos no suceden. C, D: el Ca^{2+} no afecta a la fosfatasa.

14 **D** La proteína quinasa A cataliza fosforilaciones pero es activada por la unión de cAMP. A, C: ambos enzimas se encuentran fosforilados en sus formas *a*. B: la fosforilasa *b* es activada alostéricamente por la unión de AMP. E: la forma *a* de la sintasa es la forma no fosforilada.

15 Anaeróbicamente hay una producción neta de 2 mol de ATP/mol de glucosa. Aeróbicamente se obtiene el mismo resultado neto de 2 ATP más 2 NADH porque el producto es el piruvato. Imaginemos que la célula utiliza la lanzadera del malato-aspartato mediante la que cada NADH produce $2\frac{1}{2}$ ATP. De este modo el rendimiento neto es de 7 mol ATP/mol de glucosa. Cada piruvato se convierte en AcCoA y el AcCoA se oxida mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Cada mol de piruvato produce entonces 12,5 mol de ATP o 25 mol de ATP por 2 piruvatos. Esto da un total de 32 mol de ATP/mol de glucosa aeróbicamente (véase Capítulo 13). Por tanto, la glucólisis se ha de producir 16 veces más rápidamente en condiciones anaeróbicas para generar la misma cantidad de ATP que la producida aeróbicamente.

16 En ambos casos, el glucógeno hepático se agota con lo que la gluconeogénesis es la fuente principal de glucosa sanguínea. El metabolismo del alcohol por el hígado produce grandes cantidades de NADH. Esto desplaza el equilibrio de piruvato-lactato hacia el lactato y el del oxalacetato-malato hacia el malato. Para poder ser utilizado por la gluconeogénesis, el lactato se ha de convertir previamente en piruvato. El oxalacetato proveniente del piruvato o de cadenas carbonadas de aminoácidos debe convertirse en fosfo*enol*piruvato para poder sintetizar glucosa.



15

METABOLISMO GLUCÍDICO II: RUTAS ESPECIALES Y GLUCOCONJUGADOS

Nancy B. Schwartz

15.1 VISIÓN GENERAL 666

15.2 RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO 666

La ruta de las pentosas fosfato tiene dos fases 666
La glucosa 6-fosfato se oxida y descarboxila dando una pentosa fosfato 666
Las interconversiones de las pentosas fosfato producen intermedios glucolíticos 668
La glucosa 6-fosfato puede oxidarse completamente hasta CO_2 670
La ruta de las pentosas fosfato produce NADPH 671

15.3 INTERCONVERSIONES DE AZÚCARES Y FORMACIÓN DE AZÚCARES UNIDOS A NUCLEÓTIDO 671

La isomerización y la fosforilación son reacciones comunes en la interconversión de glúcidos 671
Los azúcares unidos a nucleótidos son intermedios en muchas transformaciones de azúcares 673
La epimerización interconvierte glucosa y galactosa 673
El ácido glucurónico se forma por oxidación de la UDP-glucosa 674
La descarboxilación, oxidorreducción y transamidación de azúcares da lugar a productos necesarios 675
Los ácidos siálicos se forman a partir de la *N*-acetilglucosamina 677

15.4 BIOSÍNTESIS DE GLÚCIDOS COMPLEJOS 678

15.5 GLUCOPROTEÍNAS 679

Las glucoproteínas contienen cantidades variables de glúcidos 679
Los glúcidos se unen covalentemente a las glucoproteínas mediante enlaces *N*- u *O*-glucosídicos 680
La síntesis de glucoproteínas con enlaces *N* requiere dolicol fosfato 681

15.6 PROTEOGLUCANOS 683

El hialuronato es un copolímero de *N*-acetilglucosamina y ácido glucurónico 684
Los condroitina sulfatos son los glucosaminoglucanos más abundantes 684
El dermatán sulfato contiene ácido L-idurónico 684
La heparina y el heparán sulfato difieren de otros glucosaminoglucanos 685
El queratán sulfato existe en dos formas 686
La biosíntesis de condroitina sulfato es característica de la formación de glucosaminoglucanos 686

BIBLIOGRAFÍA 689

PREGUNTAS 689

RESPUESTAS 690

APLICACIONES CLÍNICAS

15.1 Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa: deficiencia genética o presencia de variantes genéticas en los eritrocitos 668
15.2 Síndrome de Wernicke-Korsakoff: Deficiencia o presencia de variante genéticas de la transcetolasa 670
15.3 Síndromes de glucoproteína deficiente en glúcidos (CDGS) 672
15.4 Fructosuria esencial e intolerancia a la fructosa: deficiencias de fructoquinasa y fructosa 1-fosfato aldolasa 673
15.5 Galactosemia: incapacidad de transformar la galactosa en glucosa 674
15.6 Pentosuria: déficit de xilitol deshidrogenasa 675
15.7 Ácido glucurónico: significación fisiológica de la formación de glucurónidos 675
15.8 Componentes de los grupos sanguíneos 679
15.9 Marcador glucídico común de destinación lisosómica y enfermedad de la célula I 682
15.10 Aspartilglucosilaminuria: ausencia de 4-L-aspartilglucosamina amidohidrolasa 683
15.11 Enfermedades de glucolípidos 683
15.12 La heparina es un anticoagulante 685
15.13 Condrodistrofias debidas a defectos de sulfatación 687
15.14 Mucopolisacaridosis 688

15.1 VISIÓN GENERAL

Además del catabolismo de la glucosa, que tiene el fin específico de producir energía en forma de ATP, existen en las células diversas rutas implicadas en el metabolismo de azúcares. En las células animales tiene singular importancia una de ellas, la **vía de las pentosas fosfato**, conocida también como la **desviación de las hexosas monofosfato** o **ruta del 6-fosfogluconato**. Esta vía funciona paralelamente a la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para la producción de poder reductor en forma de NADPH e intermedios de tipo pentosa. Previamente, se ha mencionado que el NADPH sirve de dador de hidrógeno y de electrones en reacciones biosintéticas reductoras, mientras que, en la mayoría de las reacciones metabólicas, el NADH se oxida por la cadena respiratoria para producir ATP (Capítulo 13). Los enzimas implicados en esta vía están localizados en el citosol, lo que indica que la oxidación no depende de las mitocondrias o del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Otra función importante de esta vía es convertir hexosas en pentosas, especialmente ribosa 5-fosfato. Este azúcar de cinco átomos de carbono y sus derivados son componentes del ATP, CoA, NAD, FAD, RNA y DNA. La vía de las pentosas fosfato también cataliza la **interconversión** de azúcares de 3, 4, 6 y 7 átomos de carbono, algunos de los cuales entran en la secuencia glucolítica. Existen también rutas específicas para la síntesis y degradación de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (aparte del glucógeno) y una serie de interconversiones químicas mediante las cuales un azúcar puede ser convertido en otro. Todos los monosacáridos y la mayoría de los oligo- y polisacáridos que se sintetizan a partir de monosacáridos pueden provenir de la glucosa. Las reacciones de interconversión, en las que un azúcar se transforma en otro, pueden realizarse directamente o a nivel de azúcares unidos a nucleótidos. Además del papel capital que desempeñan en la transformación de glúcidos, los azúcares unidos a nucleótidos son también la forma activada obligada para la síntesis de polisacáridos. Los monosacáridos se presentan a menudo como componentes de macromoléculas más complejas, como los oligo- o polisacáridos, glucoproteínas, glucolípidos y proteoglucanos. En los animales superiores, estos glúcidos complejos se encuentran fundamentalmente en el espacio extracelular de los tejidos y asociados a las membranas celulares. También, a menudo realizan funciones más dinámicas, tales como marcadores de reconocimiento y determinantes de especificidad biológica. En este capítulo, la discusión de los glúcidos complejos se restringe a la química y biología de aquellos glúcidos complejos que están presentes en tejidos y fluidos animales. Para un tratamiento detallado de la nomenclatura y química de los glúcidos, véase el Apéndice (p. 1172).

15.2 RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

La ruta de las pentosas fosfato tiene dos fases

La vía oxidativa de las pentosas fosfato constituye un modo de cortar carbono a carbono la cadena carbonada de una molécula de azúcar. Sin embargo, a diferencia del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la actuación de esta vía no tiene lugar como un conjunto de reacciones consecutivas que conducen directamente desde la glucosa 6-fosfato (G6P) a seis moléculas de CO_2. La ruta puede visualizarse como si ocurriese en dos fases. En la primera, la hexosa se descarboxila a pentosa a través de dos reacciones de oxidación que conducen a la formación de NADPH. La ruta continúa entonces y, mediante una serie de transformaciones, seis moléculas de pentosa experimentan un reordenamiento para dar lugar a cinco moléculas de hexosa.

La glucosa 6-fosfato se oxida y descarboxila dando una pentosa fosfato

La primera reacción de la vía de las pentosas fosfato (Figura 15.1) es la **deshidrogenación** de la G6P en el C-1 para formar **6-fosfoglucono-δ-lactona** y **NADPH** catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, que es el punto principal de regulación de la vía. Este enzima tiene un interés especial a causa de la fuerte anemia que puede producirse por la ausencia de **G6P deshidrogenasa** en los eritrocitos o por la

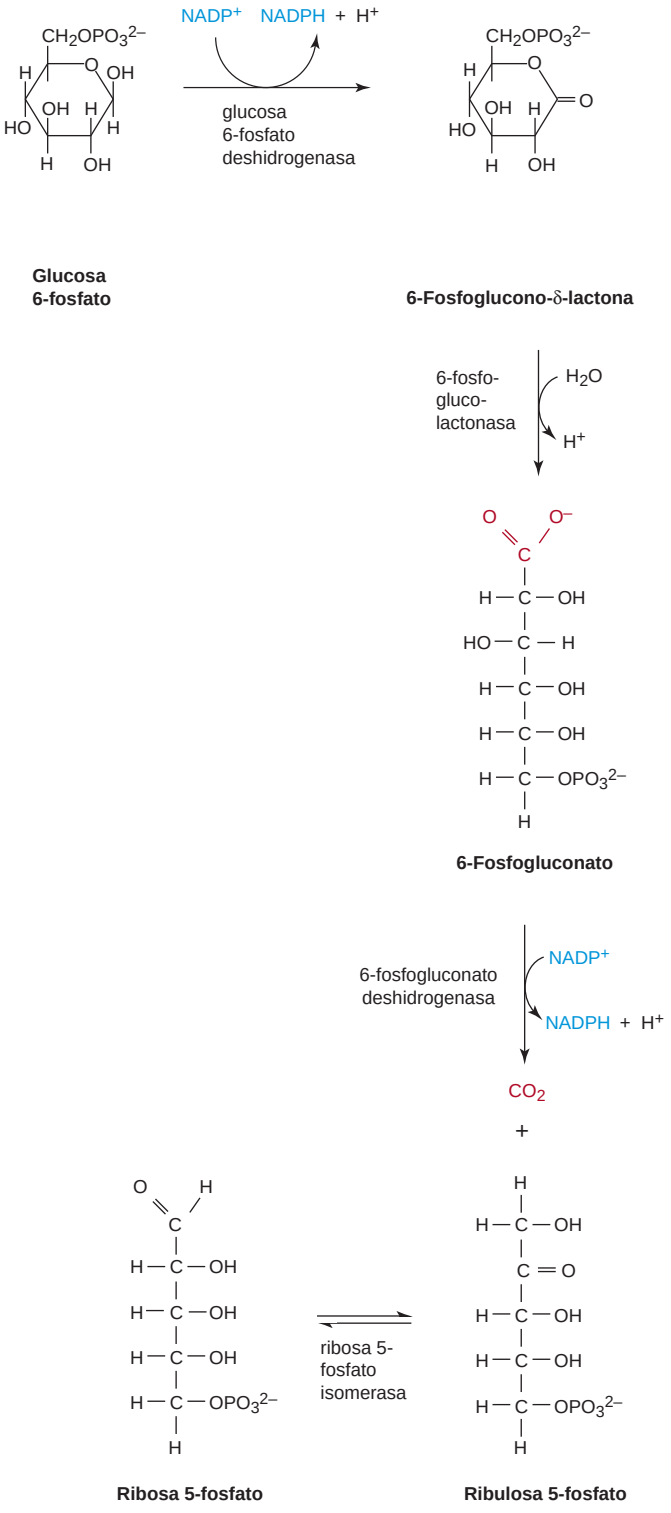
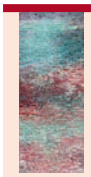


FIGURA 15.1
Fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato: formación de pentosa fosfato y NADPH.

presencia de una entre diversas variantes genéticas del enzima (Apli. Clín. 15.1). El producto intermedio de esta reacción, una lactona, es un sustrato de la gluconolactonasa, lo que asegura que la reacción sea completa. El equilibrio global de estas dos reacciones está muy desplazado en la dirección del NADPH, y mantiene una alta proporción NADPH/$NADP^+$ dentro de las células. La **6-fosfogluconato deshidroge-**



APLICACIÓN CLÍNICA 15.1

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa: deficiencia genética o presencia de variantes genéticas en los eritrocitos

Cuando se administran algunos fármacos aparentemente inocuos tales como antipalúdicos, antipiréticos o antibióticos sulfamídicos a pacientes sensibles, puede producirse en éstos una anemia hemolítica aguda al cabo de 48–96 h. La susceptibilidad a la enfermedad hemolítica inducida por fármacos puede deberse a un déficit de la actividad G6P deshidrogenasa de los eritrocitos, y fue uno de los primeros indicios de que existen deficiencias genéticas de este enzima ligadas al cromosoma X. Este enzima, que cataliza la oxidación de G6P a 6-fosfogluconato y la reducción de $NADP^+$, es muy importante ya que la vía de las pentosas fosfato es la principal ruta para la producción de NADPH en el hematíe. Por ejemplo, los hematíes con carencia relativamente suave, de tipo A, de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa son capaces de oxidar la glucosa a una velocidad normal cuando la demanda de NADPH es normal. Sin embargo, si se incrementa la tasa de oxidación del NADPH, las células deficitarias del enzima no son capaces de aumentar adecuadamente la velocidad de oxidación de la glucosa ni la de producción de dióxido de carbono. Además, las células que carecen de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa no reducen suficiente $NADP^+$ para mantener el glutatión en su estado reducido. El glutatión reducido es necesario para la integridad de la membrana eritrocitaria, y por esta razón, los hematíes que carecen del enzima son más susceptibles a la hemólisis por una amplia gama de compuestos. Por tanto, la anormalidad básica en la deficiencia de G6P es la formación de hematíes maduros que tienen una actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa disminuida. Los hematíes jóvenes pueden tener una actividad enzimática significativamente mayor que las células más viejas, debida a una variedad inestable del enzima. Después de un episodio de hemólisis, los hematíes jóvenes predominan, y puede no ser posible diagnosticar esta deficiencia genética hasta que la población de hematíes envejece. Esta deficiencia enzimática, que no es normalmente detectada hasta la administración de ciertos fármacos, ilustra la interconexión entre herencia y ambiente en la producción de la enfermedad. Los defectos en el enzima son sólo una de las diversas anormalidades que pueden afectar la actividad enzimática, habiéndose detectado otras que son independientes de la administración de fármacos. Existen más de 300 variantes genéticas conocidas de este enzima, que contiene 516 aminoácidos, que explican una amplia gama de síntomas. Estas variantes pueden ser distinguidas mediante ciertas diferencias clínicas, bioquímicas, y moleculares.

nasa cataliza una segunda deshidrogenación y descarboxilación, y produce una pentosa fosfato, la **ribulosa 5-fosfato**, y una segunda molécula de NADPH. El paso final en la síntesis de ribosa 5-fosfato es la **isomerización** de la ribulosa 5-fosfato por la **ribosa isomerasa** que tiene lugar a través de un intermedio enodiol. En ciertas condiciones metabólicas, la vía de las pentosas fosfato puede acabar en este punto, con la utilización del NADPH en reacciones biosintéticas reductoras y de la ribosa 5-fosfato como un precursor para la síntesis de nucleótidos. La ecuación global se puede escribir:

$$\text{glucosa 6-fosfato} + 2\ NADP^+ + H_2O \rightleftharpoons \text{ribosa 5-fosfato} + 2\ NADPH + 2\ H^+ + CO_2$$

Las interconversiones de las pentosas fosfato producen intermedios glucolíticos

En ciertas células se necesita más NADPH para la **biosíntesis reductora** que ribosa 5-fosfato para la incorporación en nucleótidos. Existe un sistema de **reordenamiento de azúcares** (Figura 15.2) que lleva a la formación de triosas, tetrosas, hexosas y heptosas a partir de las pentosas, creando así un **sistema de eliminación** de la ribosa 5-fosfato, así como una unión reversible entre la vía de las pentosas fosfato y la glucólisis, a través de intermediarios comunes a ambas rutas. Con el fin de permitir las interconversiones, debe formarse primero otra pentosa fosfato, la **xilulosa 5-fosfato**, mediante isomerización de la **ribulosa 5-fosfato** por acción de la **fosfopentosa epimerasa**. En consecuencia, ribulosa 5-fosfato, ribosa 5-fosfato y xilulosa 5-fosfato existen como una mezcla en equilibrio, pudiendo experimentar posteriores transformaciones catalizadas por la transcetolasa y la transaldolasa.

La **transcetolasa**, enzima que requiere tiamina pirofosfato (TPP) y Mg^{2+}, transfiere una unidad de C_2, designada como "glicolaldehído" activo, desde la xilulosa 5-fosfato a la ribosa 5-fosfato, produciendo así el azúcar de 7 carbonos sedoheptulosa y gliceraldehído 3-fosfato, un intermediario de la glucólisis. Alteraciones de la transcetolasa pueden producir el síndrome de Wernicke-Korsakoff (véase Apli. Clín. 15.2). En una segunda reacción de transferencia, catalizada por la **transaldolasa**, se transfiere una unidad tricarbonada (dihidroxiacetona) desde la sedoheptulosa 7-fosfato al gliceraldehído 3-fosfato, formando así la tetrosa, eritrosa 4-fosfato, y fructosa 6-fosfato, otro intermediario de la glucólisis. En una tercera reacción la transceto-

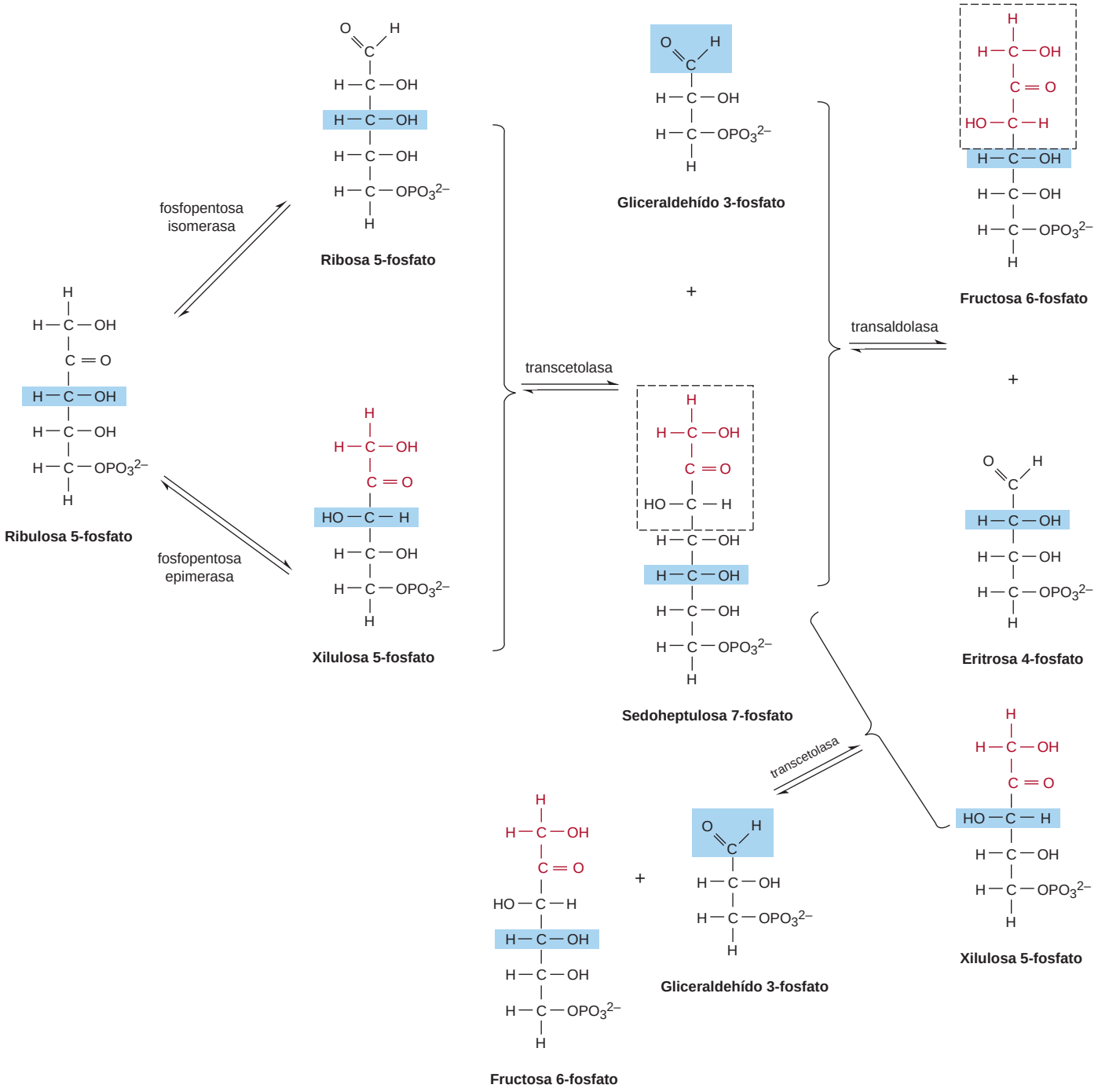


FIGURA 15.2
Reacciones no oxidativas de la ruta de las pentosas fosfato: interconversiones de pentosas fosfato.

lasa cataliza la síntesis de fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, formando dos intermediarios glucolíticos a partir de eritrosa 4-fosfato y una segunda molécula de xilulosa 5-fosfato. La suma de estas reacciones es

2 Xilulosa 5-fosfato + ribosa 5-fosfato
$\rightleftharpoons$ 2 fructosa 6-fosfato + gliceraldehído 3-fosfato

Puesto que la xilulosa 5-fosfato proviene de la ribosa 5-fosfato, la reacción neta empezando desde ribosa 5-fosfato es

3 ribosa 5-fosfato $\rightleftharpoons$ 2 fructosa 6-fosfato + gliceraldehído 3-fosfato

APLICACIÓN CLÍNICA 15.2

Síndrome de Wernicke-Korsakoff: Deficiencia o presencia de variante genéticas de la transcetolasa

Los síntomas del síndrome Wernicke-Korsakoff se hacen aparentes después de un estrés moderado que no afecta a los individuos normales. La base molecular de este síndrome es una alteración de la transcetolasa que reduce de manera significativa (> 10 veces) su afinidad por la tiamina pirofosfato (TPP). Las fluctuaciones en la concentración de TPP son comunes y no afectan a los individuos normales cuya transcetolasa fija el TPP de forma suficientemente fuerte de modo que deficiencias moderadas de tiamina no afectan la función enzimática. Por el contrario, los individuos con Wernicke-Korsakoff se vuelven sintomáticos cuando las concentraciones de TPP caen por debajo de la necesaria para saturar la transcetolasa anormal. El síndrome se manifiesta como un desorden mental acompañado de pérdida de memoria y parálisis parcial y pueden hacerse patentes en alcohólicos cuya dieta puede ser pobre en tiamina.

Por tanto, el exceso de ribosa 5-fosfato, tanto si proviene de la primera fase de la ruta de las pentosas fosfato como del metabolismo degradativo de los ácidos nucleicos, es eliminado de modo efectivo convirtiéndolo en intermediarios que pueden entrar en el flujo de carbono de la glucólisis.

La glucosa 6-fosfato puede oxidarse completamente hasta CO_2

En ciertos tejidos, como por ejemplo en la glándula mamaria durante la lactancia, también existe una vía para la **oxidación** completa de la **G6P** a CO_2 con la reducción simultánea de $NADP^+$ a NADPH (Figura 15.3). Mediante una compleja secuencia de reacciones, la ribulosa 5-fosfato producida en la vía de las pentosas fos-

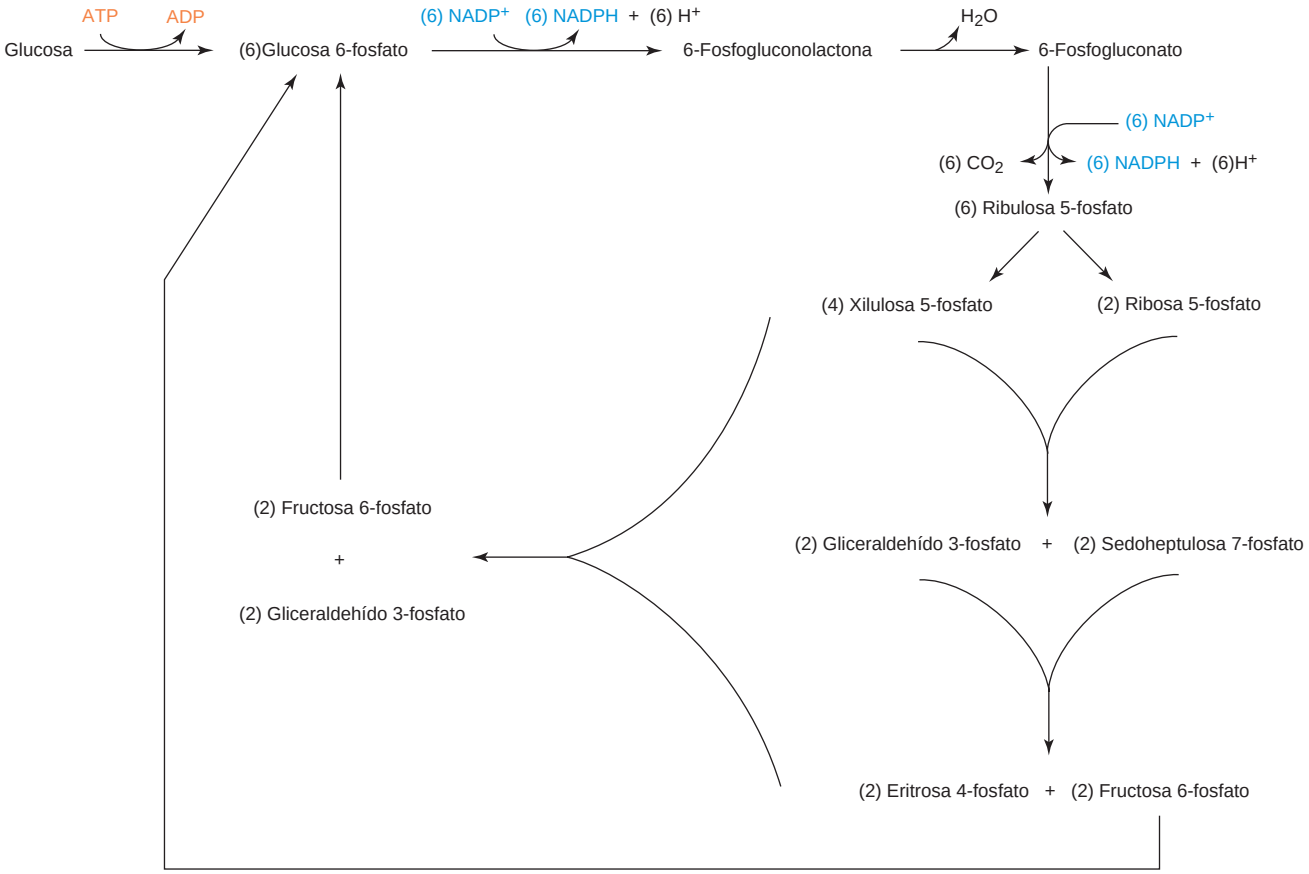


FIGURA 15.3
Ruta de las pentosas fosfato.

fato es reciclada a G6P por la transcetolasa, transaldolasa y diversos enzimas de la vía gluconeogénica. En este sistema, la hexosa entra de forma continua, y se genera CO_2 como único compuesto carbonado. Una ecuación igualada de este proceso implicaría la oxidación de seis moléculas de G6P a seis moléculas de ribulosa 5-fosfato y 6 moléculas de CO_2. Esto se corresponde esencialmente con la primera parte de la vía de las pentosas fosfato y da lugar a la transferencia de 12 pares de electrones al $NADP^+$, cantidad requerida para la oxidación total de una glucosa a seis CO_2. Las seis moléculas restantes de ribulosa 5-fosfato se reordenan a continuación por la vía descrita anteriormente para regenerar cinco moléculas de G6P. La ecuación global puede escribirse

$$6 \text{ glucosa 6-fosfato} + 12\ NADP^+ + 7\ H_2O \rightleftharpoons 5 \text{ glucosa 6-fosfato} + 6\ CO_2 + 12\ NADPH + 12\ H^+ + P_i$$

La reacción neta es, por tanto

$$\text{glucosa 6-fosfato} + 12\ NADP^+ + 7\ H_2O \rightleftharpoons 6\ CO_2 + 12\ NADPH + 12\ H^+ + P_i$$

La ruta de las pentosas fosfato produce NADPH

La vía de las pentosas fosfato sirve para diversos fines, entre los que se incluye la síntesis y degradación de azúcares que no sean hexosas, especialmente las pentosas necesarias para la síntesis de nucleótidos y otros intermedios glucolíticos. De la máxima importancia es la capacidad de sintetizar NADPH, el cual juega un papel especial en las reacciones biosintéticas. Las necesidades de la célula de NADPH o azúcares intermediarios determinan mayoritariamente la dirección del flujo y la vía seguida por la G6P una vez que se halla dentro de la ruta de las pentosas fosfato. Cuando se necesita más NADPH que ribosa 5-fosfato la ruta conduce a la oxidación completa de la G6P a CO_2 y resíntesis de G6P a partir de la ribulosa 5-fosfato. Alternativamente, si se requiere más ribosa 5-fosfato que NADPH, la G6P se convierte en fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato mediante la vía glucolítica.

La distribución de la vía de las pentosas fosfato en los tejidos está de acuerdo con sus funciones. La ruta está presente en los eritrocitos para la producción de NADPH, el cual a su vez se utiliza para generar glutatión reducido, esencial para el mantenimiento de la estructura normal del eritrocito. También es activa en tejidos tales como el hígado, glándula mamaria, testículos y corteza adrenal, que son centros activos de síntesis de ácidos grasos o esteroides, procesos que requieren también el poder reductor del NADPH. Por el contrario, en el músculo estriado de mamífero, en donde la síntesis de ácidos grasos o esteroides es muy reducida, todo el catabolismo discurre por la vía de la glucólisis y el ciclo TCA y no se produce oxidación directa de la glucosa 6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato. En otros tejidos, como por ejemplo el hígado, el 20–30% del CO_2 producido puede provenir de la vía de las pentosas fosfato, y el equilibrio entre la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato depende entonces de los requerimientos metabólicos de la célula.

15.3 | INTERCONVERSIONES DE AZÚCARES Y FORMACIÓN DE AZÚCARES UNIDOS A NUCLEÓTIDO

Cuando se consideran los principios generales del metabolismo de los glúcidos, deben incluirse ciertos aspectos del origen y destino de otros monosacáridos que no sean la glucosa y la ribosa, de oligosacáridos y polisacáridos. La mayoría de los monosacáridos presentes en compuestos biológicos provienen de la glucosa. En la Figura 15.4 se resumen las reacciones de transformación de azúcares más comunes en los mamíferos.

La isomerización y la fosforilación son reacciones comunes en la interconversión de glúcidos

La formación de algunos azúcares, tal como la conversión de G6P en fructosa 6-fosfato por la fosfoglucosa isomerasa en la ruta glucolítica, puede tener lugar directa-

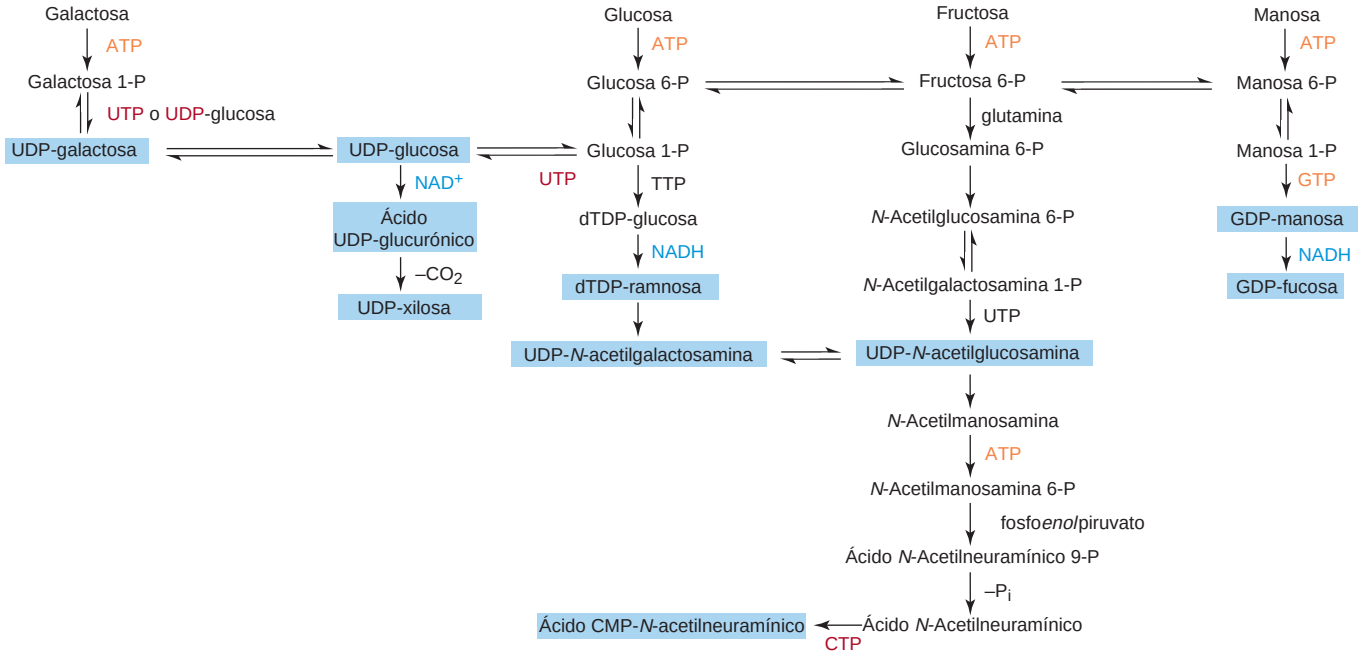
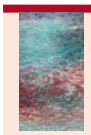


FIGURA 15.4
Rutas de formación de azúcares unidos a nucleótido e interconversiones de algunas hexosas.

mente a partir de la glucosa, y mediante sucesivas reacciones de modificación. Una **isomerización aldosa–cetosa** similar, catalizada por la **fosfomanosa isomerasa**, da lugar a la síntesis de manosa 6-fosfato. Defectos en este enzima pueden dar lugar a una forma de síndrome de glucoproteína deficitaria en glúcido (CDGS) (véase Apli. Clín. 15.3)

Otra modificación usual es la transferencia interna, en la misma molécula de azúcar, de un grupo fosfato desde un grupo hidroxilo a otro. La glucosa 1-fosfato producida en la fosforólisis enzimática del glucógeno, es convertida en G6P por la fosfoglucomutasa. La galactosa también puede ser fosforilada directamente a galactosa 1-fosfato por la galactoquinasa, y la manosa puede serlo a manosa 6-fosfato por la manoquinasa. La fructosa libre, que es un componente importante de la dieta, puede ser fosforilada en el hígado por una fructoquinasa especial, dando así fructosa 1-fosfato. Sin embargo, no existe ninguna mutasa para interconvertir la fructosa 1-fosfato y la fructosa 6-fosfato, ni la fosfofructoquinasa puede sintetizar fruc-



APLICACIÓN CLÍNICA 15.3
Síndromes de glucoproteína deficiente en glúcidos (CDGS)

Los CDGS son un grupo en expansión de defectos de la glucosilación autosómicos recesivos clínicamente heterogéneos. Mediante la utilización del estado de glucosilación de la transferrina sérica como indicador sensible, se han identificado hasta el momento cuatro tipos de CDGS (I a IV). El tipo I es el más común y ahora se subdivide en tres formas distintas, dos de las cuales se encuentran en la ruta biosintética temprana de la manosa (Figura 15.4). El tipo Ib, que se presenta en el primer año de vida con hipoglucemia, vómitos, diarrea, enteropatía con pérdida de proteína, fibrosis hepática y susceptibilidad a trombosis recurrente debido a bajos niveles de antitrombina III, se debe a una deficiencia de actividad fosfomanosa isomerasa. Defectos en una forma del siguiente enzima de la ruta, fosfomanomutasa 2, son responsables de la CDGS tipo Ia que constituye alrededor del 70% de todos los pacientes de CDGS tipo I. Entre los síntomas clínicos se cuentan la hipotonía, dismorfismo, disfunción hepática, retrasos del desarrollo motor y del lenguaje y falta de crecimiento; alrededor del 20% de pacientes con esta enfermedad genética mueren dentro de los primeros años de vida. Una tercera forma, CDGS tipo Ic, muestra un fenotipo de glucosilación de la transferrina similar pero es debido a defectos en la última parte de la ruta biosintética de la glucoproteína, por ejemplo, la glucosiltransferasa que añade el primer residuo glucosilo al precursor $Man_9GlcNac_2$-PP-Dol. La CDGS tipo II también es debida a deficiencias en un paso tardío de la ruta en la *N*-acetilglucosaminiltransferasa II, que inicia la segunda antena unida por *N*-. La etiología molecular de las CDGS tipos III y IV está por identificar. Parece, por tanto, que hay una constelación de síndromes causados por defectos en las rutas biosintéticas de interconversión de monosacáridos o biosíntesis de glucoproteínas que se caracterizan por la aparición neonatal de disfunciones neurológicas y metabólicas graves.

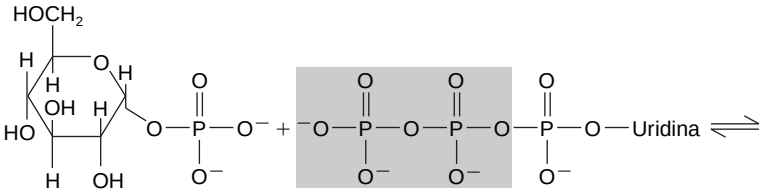
tosa-1,6-bisfosfato a partir de la fructosa 1-fosfato. En vez de esto, una fructosa 1-fosfato aldolasa rompe la fructosa 1-fosfato a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), la cual entra directamente en la ruta glucolítica, y gliceraldehído, el cual debe, en primer lugar ser reducido a glicerol, después ser fosforilado, y finalmente ser reoxidado a DHAP. La carencia de esta aldolasa conduce a intolerancia a la fructosa (véase Apli. Clín. 15.4).

Los azúcares unidos a nucleótidos son intermedios en muchas transformaciones de azúcares

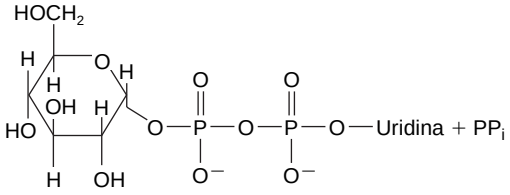
La mayor parte de las restantes reacciones de transformación de azúcares requieren la conversión previa de éstos en **azúcares ligados a nucleótidos**. La formación de un azúcar unido a un nucleósido difosfato (NDP) implica la reacción de hexosa 1-fosfato, y un nucleósido trifosfato (NTP), catalizada por una pirofosforilasa. Estas reacciones son fácilmente reversibles. Sin embargo, el pirofosfato *in vivo* es rápidamente hidrolizado por una pirofosfatasa, lo que impulsa la síntesis de azúcar unido a nucleótido. Estas reacciones se resumen del siguiente modo:

$$\text{NTP} + \text{azúcar 1-fosfato} + H_2O \rightleftharpoons \text{NDP-azúcar} + PP_i$$
$$PP_i + H_2O \rightleftharpoons 2\ P_i$$
$$\text{NTP} + \text{azúcar 1-fosfato} + H_2O \rightleftharpoons \text{NDP-azúcar} + 2\ P_i$$

La UDP-glucosa es un azúcar unido a nucleótido común, implicada en la síntesis del glucógeno y de glucoproteínas. La UDP-glucosa se sintetiza a partir de la glucosa 1-fosfato y UTP, en una reacción catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa.



Glucosa

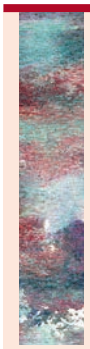


UDP-Glucosa

Los azúcares unidos a nucleósido difosfato contienen dos enlaces fosforilo cada uno de ellos con una ΔG negativa de hidrólisis elevada, lo que contribuye a otorgar a estos compuestos su carácter de alta energía como dadores de glucosilo en reacciones posteriores de transformación y de transferencia, así como a conferirles especificidad sobre los enzimas que catalizan estas reacciones. Por ejemplo, la uridina difosfato actúa normalmente como portador de glucosilo, mientras que el ADP, GDP y CMP actúan como portadores en otras reacciones. Muchas de las reacciones de transformación de azúcares, entre las que se incluyen la epimerización, la oxidación, la descarboxilación, la reducción y el reordenamiento, sólo tienen lugar a nivel de azúcares unidos a nucleótido.

La epimerización interconvierte glucosa y galactosa

La **epimerización** es un tipo de reacción frecuente en el metabolismo de los glúcidos. La conversión reversible de la glucosa a galactosa en los animales tiene lugar mediante epimerización de la UDP-glucosa a UDP-galactosa, catalizada por la UDP-glucosa-4-epimerasa (véase Figura 15.5). La UDP-galactosa es también un intermediario importante en el metabolismo de la galactosa libre, derivada de la hidrólisis de la lactosa en el tracto intestinal. La galactosa es primero fosforilada por la galactoquinasa y



APLICACIÓN CLÍNICA 15.4
Fructosuria esencial e intolerancia a la fructosa: deficiencias de fructoquinasa y fructosa 1-fosfato aldolasa

La fructosa puede constituir entre el 30 y el 60% de la ingesta total de glúcidos por los mamíferos. Se metaboliza predominantemente por una vía específica de la fructosa. El primer enzima de esta ruta, la fructoquinasa, está ausente en la fructosuria esencial. Esta enfermedad constituye una anomalía metabólica asintomática benigna que parece heredarse de forma autosómica recesiva. Después de la ingestión de fructosa, los niveles sanguíneos y urinarios de fructosa son inusualmente elevados; no obstante, el 90% de la fructosa es finalmente metabolizada. Por el contrario, la intolerancia hereditaria a la fructosa se caracteriza por la aparición de una severa hipoglucemia después de la ingestión de fructosa. La ingestión prolongada de fructosa en los niños puede conducir a la muerte. En esta enfermedad está ausente la fructosa 1-fosfato aldolasa, por lo que la fructosa 1-fosfato se acumula intracelularmente (véase Apli. Clín. 14.3).

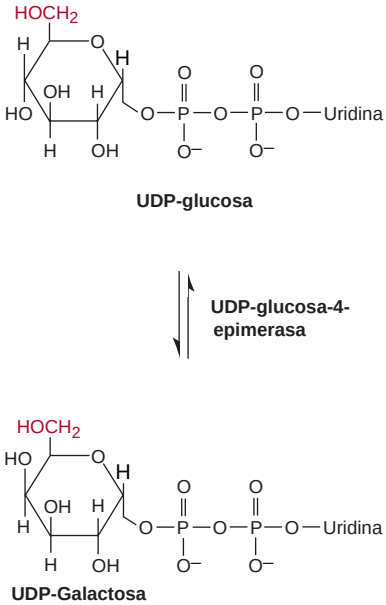


FIGURA 15.5
Conversión de glucosa en galactosa.

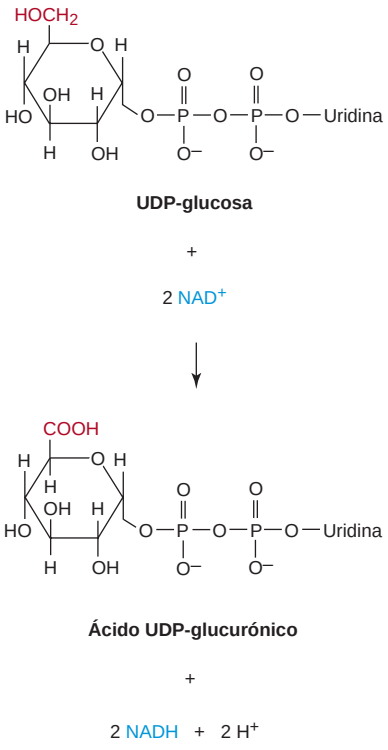


FIGURA 15.6
Formación del ácido UDP-glucurónico a partir de la UDP-glucosa.

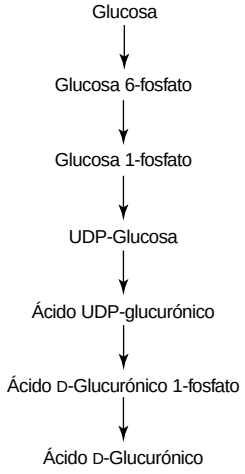


FIGURA 15.7
Biosíntesis del ácido D-glucurónico a partir de la glucosa.

ATP, dando galactosa 1-fosfato. A continuación la galactosa 1-fosfato uridililtransferasa transforma la galactosa 1-fosfato en UDP-galactosa, al desplazar la glucosa 1-fosfato de la UDP-glucosa. Estas reacciones pueden resumirse de la siguiente forma:

$$\text{galactosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{galactosa 1-fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{UDP-glucosa} + \text{galactosa 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{UDP-galactosa} + \text{glucosa 1-fosfato}$$

Una combinación de estas reacciones permite una transformación eficiente de la galactosa de la dieta en glucosa 1-fosfato, la cual puede después ser metabolizada mediante las rutas anteriormente descritas. Por otro lado, la 4-epimerasa puede operar en la dirección opuesta cuando se necesita UDP-galactosa para biosíntesis. Una enfermedad hereditaria, la galactosemia, tiene lugar como consecuencia de la falta de esta uridililtransferasa y se caracteriza por una síntesis y disponibilidad disminuidas de UDP-galactosa (Apli. Clín. 15.5).

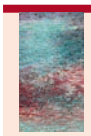
La epimerización es una de las tres reacciones diferentes implicadas en la síntesis de GDP-fucosa (véase Figura 15.4). Este conjunto empieza con la conversión de GDP-manosa en GDP-4-ceto-6-desoximanosa catalizada por la GDP-manosa-4,6-deshidratasa. A continuación se produce la GDP-fucosa a partir de la GDP-4-ceto-6-desoximanosa mediante una reacción en dos pasos que implican la conversión dependiente de 3,5-epimerasa a GDP-4-ceto-6-desoxi-L-galactosa seguida de la formación de GDP-fucosa dependiente de una 4-reductasa. Estas dos últimas reacciones están catalizadas por un polipéptido sencillo, la GDP-4-ceto-6-desoximanosa 3,5-epimerasa-4-reductasa; también se conoce como proteína FX que es una proteína abundante del eritrocito.

Las reacciones de epimerización no están restringidas exclusivamente a azúcares ligados a nucleótidos, sino que también pueden tener lugar a nivel polimérico. Así, el ácido D-glucurónico se epimeriza a ácido L-idurónico después de su incorporación en la heparina y en el dermatán sulfato (véase la Sección 15.6, p. 684).

El ácido glucurónico se forma por oxidación de la UDP-glucosa

El **ácido glucurónico** se forma por oxidación de la UDP-glucosa, catalizada por la **UDP-glucosa deshidrogenasa** (Figura 15.6) y muy probablemente sigue el esquema de la Figura 15.7. En los seres humanos, el ácido glucurónico se convierte en L-xilulosa, la cetopentosa que es excretada en la pentosuria esencial (Apli. Clín. 15.6), y que participa en la destoxificación mediante producción de conjugados glucurónidos (Apli. Clín. 15.7).

El ácido glucurónico es un precursor del **ácido L-ascórbico** en aquellos animales que sintetizan vitamina C. El ácido glucurónico libre puede metabolizarse por reducción con NADPH a ácido L-gulónico (Figura 15.8), que en las plantas y la mayoría de los animales superiores se convierte mediante un proceso de dos pasos a través de L-gulonolactona en ácido L-ascórbico (vitamina C). El ser humano, otros primates y el conejillo de Indias carecen del enzima que transforma la L-gulonolactona en ácido L-ascórbico, por lo que deben satisfacer sus necesidades de ácido as-

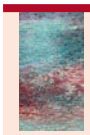


APLICACIÓN CLÍNICA 15.5

Galactosemia: incapacidad de transformar la galactosa en glucosa

Las reacciones de la galactosa son de interés especial porque están sujetas en los seres humanos a defectos genéticos que dan lugar a la enfermedad genética galactosemia. Cuando se da este defecto, los individuos son incapaces de metabolizar la galactosa derivada de la lactosa (azúcar de la leche) a metabolitos de la glucosa, lo que provoca a menudo formación de cataratas, detención del crecimiento, retraso mental, o incluso la muerte como consecuencia del deterioro hepático. La perturbación genética se manifiesta en forma de deficiencia celular ya sea de galactoquinasa, lo que produce una enfermedad relativamente leve caracterizada por la formación prematura de cataratas, o de galactosa 1-fosfato uridiltransferasa, lo que produce una enfermedad grave.

La galactosa puede reducirse a galactitol mediante una reacción parecida a la que transforma la glucosa en sorbitol. El galactitol inicia la formación de cataratas en el cristalino, y puede estar relacionado con los daños que sufre el sistema nervioso central. La acumulación de galactosa 1-fosfato ocasiona el fallo hepático; los efectos tóxicos de los metabolitos de la galactosa desaparecen cuando se suprime ésta de la dieta.



APLICACIÓN CLÍNICA 15.6

Pentosuria: déficit de xilitol deshidrogenasa

Probablemente, la vía de la oxidación del ácido glucurónico no sea esencial para el metabolismo glucídico humano, ya que los individuos que tienen esta vía bloqueada no sufren efectos patológicos. Una variación metabólica, denominada pentosuria idiopática, proviene de la actividad disminuida de la L-xilulosa reductasa ligada a NADP, el enzima que cataliza la reducción de la xilulosa a xilitol. De ahí que los individuos afectados excreten grandes cantidades de pentosa en la orina, especialmente después de la ingestión de ácido glucurónico.

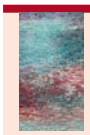
córbico mediante su ingestión. El ácido gulónico puede también ser oxidado a ácido 3-cetogulónico y descarboxilado a L-xilulosa. A su vez, la L-xilulosa es convertida por reducción en xilitol, reoxidada a D-xilulosa y fosforilada con ATP y una quinasa adecuada a xilulosa 5-fosfato. Este último compuesto puede entonces volver a entrar en la vía de las pentosas fosfato descrita anteriormente. La vía del ácido glucurónico representa otra ruta para la oxidación de la glucosa. Esta vía es operativa en el tejido adiposo, y su actividad aumenta normalmente en tejidos de animales en inanición o diabéticos.

La descarboxilación, oxidorreducción y transamidación de azúcares da lugar a productos necesarios

Aunque la descarboxilación, ya ha sido previamente tratada junto con las principales vías metabólicas la única descarboxilación conocida de un azúcar unido a nucleótido es la conversión del ácido UDP-glucurónico en UDP-xilosa. La UDP-xilosa es necesaria para la síntesis de proteoglucanos (Sección 15.6, p. 683) y es un potente inhibidor de la UDP-glucosa deshidrogenasa, el enzima que oxida la UDP-glucosa a ácido UDP-glucurónico (Figura 15.6). Así, el nivel de estos precursores de azúcares unidos a nucleótido se regula mediante este sensible mecanismo de retroalimentación.

Las **desoxihexosas** y **didesoxihexosas** también son sintetizadas mientras los azúcares precursores están unidos a nucleósidos difosfato, mediante un proceso de varios pasos. Por ejemplo, la L-ramnosa es sintetizada a partir de la glucosa por una serie de reacciones de oxidación–reducción, que empiezan con dTDP-glucosa y producen dTDP-ramnosa, catalizadas por oxidorreductasas. Una reacción similar es responsable de la síntesis de GDP-fucosa a partir de GDP-manosa (véase la sección anterior), así como de diversas didesoxihexosas.

La formación de los aminoazúcares, componentes mayoritarios de los oligo y polisacáridos humanos y constituyentes de antibióticos, tiene lugar por **transami-**



APLICACIÓN CLÍNICA 15.7

Ácido glucurónico: significación fisiológica de la formación de glucurónidos

El significado fisiológico del ácido glucurónico se basa en su capacidad para conjugarse con ciertas sustancias, endógenas y exógenas, formando así, en una reacción catalizada por la UDP-glucuroniltransferasa, un grupo de compuestos denominados colectivamente glucurónidos. La conjugación de un compuesto con ácido glucurónico produce un compuesto fuertemente ácido que es más hidrosoluble a pH fisiológico que el precursor, por lo que puede alterar su propio metabolismo, transporte o propiedades de excreción. La formación de glucurónidos es importante en la destoxificación de fármacos, la excreción de esteroides y el metabolismo de la bilirrubina. Esta última es el producto mayoritario de degradación metabólica del hemo, grupo prostético de la hemoglobina. El paso central en la excreción de la bilirrubina es su conjugación con ácido glucurónico por la UDP-glucuroniltransferasa. El desarrollo de este mecanismo de conjugación tiene lugar de forma gradual y puede tardar desde varios días hasta 2 semanas después del nacimiento para ser totalmente activo en el hombre. La denominada "ictericia fisiológica del recién nacido" proviene en la mayor parte de los casos de la incapacidad del hígado neonatal para formar glucurónido de bilirrubina a una velocidad comparable a la de producción de bilirrubina. En una cepa mutante de ratas Wistar ("Gunn") se ha descubierto un defecto en la síntesis de glucurónidos debido a una deficiencia de UDP-glucuroniltransferasa, deficiencia que da lugar a una hiperbilirrubinemia hereditaria. En seres humanos se ha descubierto un defecto similar en la ictericia no hemolítica familiar congénita (síndrome de Crigler–Najjar). Los pacientes con esta enfermedad tampoco son capaces de conjugar eficientemente compuestos extraños con ácido glucurónico.

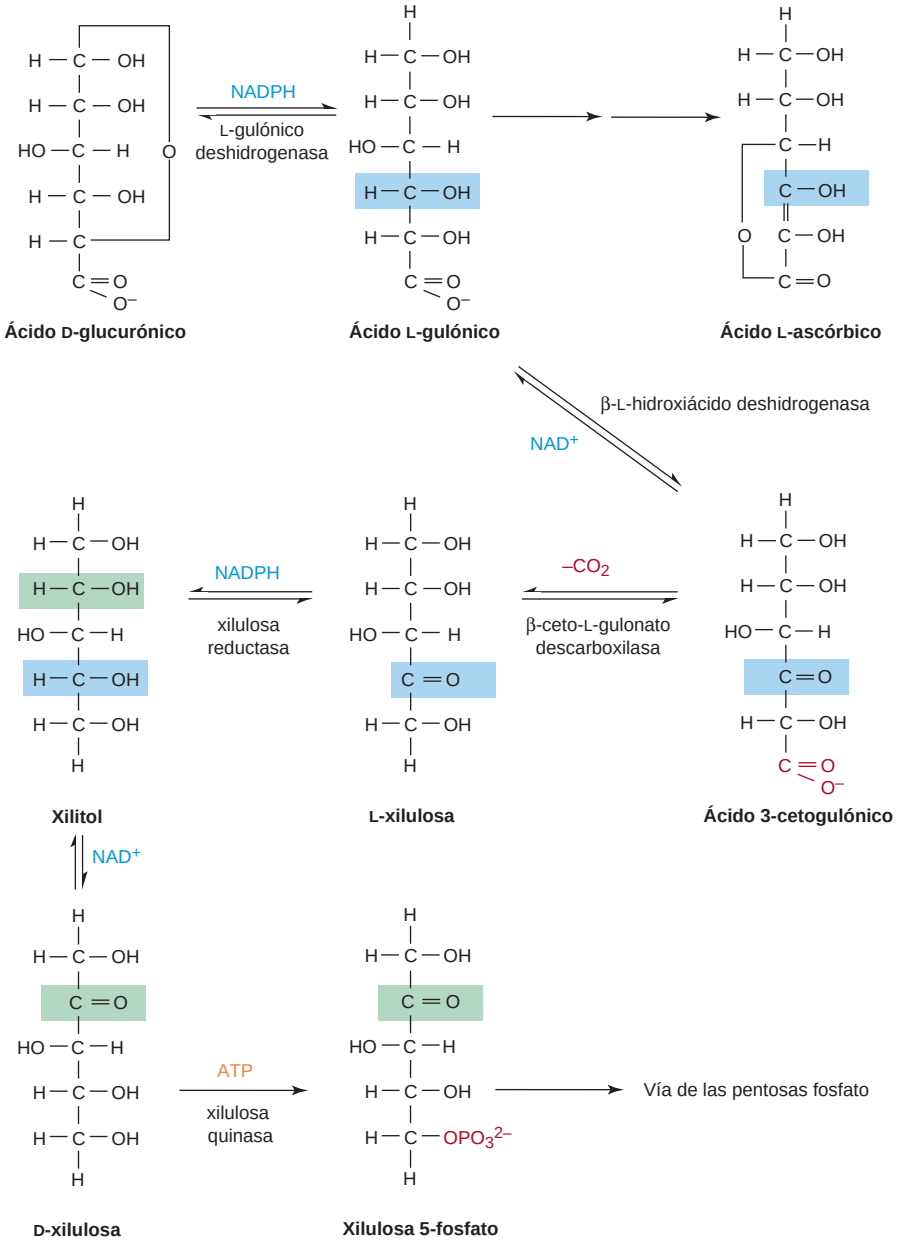
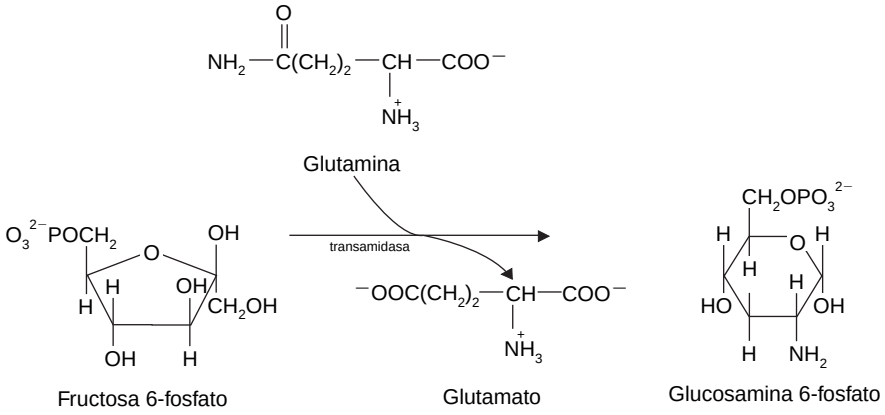


FIGURA 15.8
Vía de oxidación del ácido glucurónico.

dación. Por ejemplo, la síntesis de la glucosamina 6-fosfato tiene lugar mediante la reacción de la fructosa 6-fosfato con glutamina.



La glucosamina 6-fosfato puede entonces ser *N*-acetilada, formando *N*-acetilglucosamina 6-fosfato, lo que es seguido de isomerización a *N*-acetilglucosamina 1-fosfato. Este último azúcar se convierte en UDP-*N*-acetilglucosamina mediante reacciones similares a las de la síntesis de la UDP-glucosa. La UDP-*N*-acetilglucosamina, que es un precursor de la síntesis de glucoproteínas, puede epimerizarse a UDP-*N*-acetilgalactosamina, necesaria para la síntesis de proteoglucanos. La reacción de la fructosa 6-fosfato–glutamina transamidasa se encuentra bajo control de retroalimentación negativa por la UDP-*N*-acetilglucosamina; de este modo, se regula la síntesis de ambos azúcares unidos a nucleótidos (Figura 15.4). Esta regulación tiene sentido en ciertos tejidos, tales como la piel, en la que esta vía puede suponer hasta un 20% del flujo de glucosa.

Los ácidos siálicos se forman a partir de la *N*-acetilglucosamina

Otro producto derivado de la UDP-*N*-acetilglucosamina es el **ácido *N*-acetilneuramínico**, un miembro de una familia de azúcares de 9 carbonos, denominados **ácidos siálicos** (Figura 15.9). La primera reacción implica la epimerización de la UDP-*N*-ace-

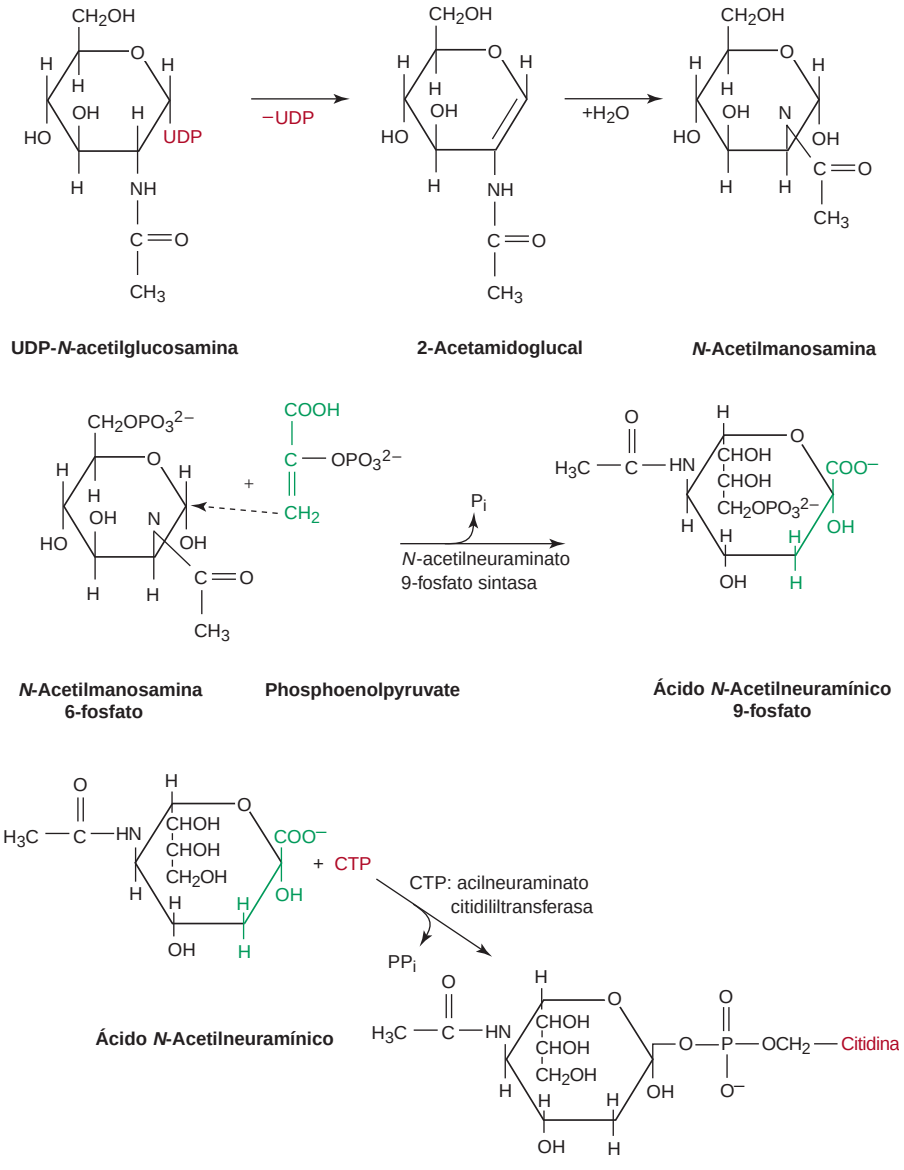


FIGURA 15.9
Biosíntesis del ácido CMP-*N*-acetilneuramínico.

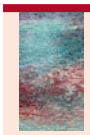
tilglucosamina por una 2-epimerasa a *N*-acetilmanosamina con eliminación simultánea de UDP. Dado que el producto monosacárido ya no está entonces unido al nucleótido, esta epimerización es claramente diferente de las consideradas previamente. Es muy posible que esta reacción de la 2-epimerasa transcurra mediante una eliminación trans del UDP, con formación del intermedio insaturado 2-acetamidoglucal. En los tejidos de mamíferos, la *N*-acetilmanosamina se fosforila probablemente por el mismo enzima que actúa como una quinasa con ATP para formar *N*-acetilmanosamina 6-fosfato, el cual se condensa seguidamente con fosfo*enol*piruvato para formar ácido *N*-acetilneuramínico 9-fosfato. Este producto se rompe por una fosfatasa que elimina fosfato y se activa con CTP formando el derivado de CMP, ácido CMP-*N*-acetilneuramínico. Este es un azúcar unido a nucleótido poco frecuente en el sentido de que sólo contiene un grupo fosfato y de que se forma mediante una reacción irreversible. Todas estas reacciones tienen lugar en el citosol, a excepción del último paso que transcurre en el núcleo con posterior exportación al citoplasma del azúcar unido a nucleótido activado. El ácido *N*-acetilneuramínico es también un precursor de otros derivados de tipo ácido siálico, algunos de los cuales se forman por modificación del grupo *N*-acetil a *N*-glicolil u *O*-acetil, una vez incorporados en una glucoproteína.

15.4 | BIOSÍNTESIS DE GLÚCIDOS COMPLEJOS

En las moléculas que contienen glúcidos complejos, los azúcares se unen entre sí mediante enlaces glucosídicos, los cuales se forman por **glucosiltransferasas** específicas. Para la síntesis de un enlace glucosídico se requiere energía, la cual se obtiene mediante el uso de azúcares unidos a nucleótido como sustratos dadores. La reacción de una glucosiltransferasa tiene lugar mediante transferencia de la unidad glucosilo desde el derivado nucleotídico al extremo no reductor de un azúcar aceptor. La naturaleza del enlace formado viene determinada por la especificidad de la glucosiltransferasa, la cual es específica para el azúcar aceptor, para el azúcar transferido y para el enlace formado; no obstante, se han descubierto excepciones al paradigma de un enzima-un enlace dado. De todos modos la síntesis de heteropolisacáridos está controlada por un mecanismo que no utiliza molde y que está dirigido por glucosiltransferasas específicas. La reacción de una glucosiltransferasa se resume de la siguiente forma:

$$\underset{\text{(dador)}}{\text{Nucleósido difosfato-glúcido}} + \underset{\text{(aceptor)}}{\text{glúcido}} \xrightleftharpoons{\text{glucosiltransferasa}} \underset{\text{(glucósido)}}{\text{glucosil}_1\text{-}O\text{-glúcido}_2} + \text{nucleósido difosfato}$$

Se han identificado en los oligosacáridos de mamíferos más de 40 enlaces glucosídicos diferentes, y unos 15 más en los polisacáridos del tejido conjuntivo. El número de enlaces posibles es aun mayor, y se origina tanto por la diversidad de monosacáridos unidos covalentemente, como por la formación de enlaces α o β, con cada uno de los grupos hidroxilo disponibles en el sacárido aceptor. El gran número y la diversidad de moléculas que pueden generarse sugiere que los oligosacáridos poseen el potencial suficiente para tener un gran contenido informacional. De hecho, se sabe que la especificidad de muchas moléculas biológicas está determinada por la naturaleza de los residuos glucídicos. Por ejemplo, la especificidad de los principales grupos sanguíneos viene determinada por los azúcares que contienen (Apli. Clín. 15.8). La *N*-acetilgalactosamina es el determinante inmunológico de la sangre del grupo A, y la galactosa el de la sangre del grupo B. La eliminación de la *N*-acetilgalactosamina de los eritrocitos del grupo A, o de la galactosa de los eritrocitos del grupo B, transforma a ambos en eritrocitos del grupo O. De forma creciente, se van reconociendo otros ejemplos de azúcares como determinantes de especificidad para los receptores de las superficies celulares y de las interacciones con las lectinas, así como de la orientación de las células hacia tejidos determinados, y de la supervivencia o la desaparición de la circulación de ciertas moléculas. Todos los enlaces glucosídicos que se han identificado en compuestos biológicos son degradados mediante enzimas hidrolíticos específicos, las glucosidasas. Además de constituir valiosas herramientas para la elucidación estructural de oligosacáridos, el interés por esta clase de sistemas enzimáticos parte del hecho de que muchas en-



APLICACIÓN CLÍNICA 15.8

Componentes de los grupos sanguíneos

La superficie del eritrocito humano está cubierta por un complejo mosaico de determinantes antigénicos específicos, muchos de los cuales son polisacáridos. Existen alrededor de unos 100 determinantes de grupos sanguíneos pertenecientes a 21 sistemas de grupos sanguíneos humanos independientes. Los determinantes antigénicos más ampliamente estudiados son los del sistema de grupos sanguíneos ABO y los del sistema de Lewis, estrechamente relacionado con el anterior. A partir del estudio de estos sistemas, se estableció una correlación definida entre actividad génica en lo referente a síntesis de glucosiltransferasas específicas y estructura de oligosacáridos. La variación genética se consigue mediante glucosiltransferasas específicas, responsables de la síntesis de determinantes heterosacáridos. Por ejemplo, el gen *H* codifica una fucosiltransferasa que adiciona fucosa a una galactosa periférica en el heterosacárido precursor. Los genes *A*, *B* y *O* se sitúan en el cromosoma 9. El gen *A* codifica una *N*-acetilgalactosamina glucosiltransferasa; el gen *B*, una galactosiltransferasa, y el gen *O*, una proteína inactiva. Los azúcares transferidos por los enzimas A y B se adicionan al oligosacárido específico de H. El gen Lewis (*Le*) codifica otra fucosiltransferasa que adiciona fucosa a un residuo de *N*-acetilglucosamina periférico del precursor. La ausencia del gen *H* da lugar al determinante específico Le^a, mientras que en ausencia de ambos enzimas, H y Le, da el producto de interacción responsable de la especificidad Le^b. La elucidación de las estructuras de estos determinantes oligosacáridos representa un hito en la química de los glúcidos. Esta información es esencial no sólo para las transfusiones sanguíneas, sino también para fines legales e históricos. Por ejemplo, se ha utilizado polvo de tejido que contenía glúcidos complejos en análisis serológicos para establecer el grupo sanguíneo de Tutankamon y sus probables antepasados.

fermedades genéticas del metabolismo de los glúcidos complejos se deben a la carencia de glucosidasas (véanse Aplis. Clíns. 15.10 y 15.11).

15.5 GLUCOPROTEÍNAS

Las **glucoproteínas** se han definido de forma restrictiva como proteínas conjugadas que contienen uno o más sacáridos como grupos prostéticos, los cuales carecen de unidad repetitiva seriada y están unidos covalentemente a una cadena peptídica. Esta definición excluye los proteoglucanos, que se exponen en la Sección 15.6 (véase p. 683).

Las funciones de las glucoproteínas en el ser humano poseen un gran interés. Las glucoproteínas de las membranas celulares pueden desempeñar un papel importante en el comportamiento de grupo de las células y en otras importantes funciones biológicas de la membrana. Una parte importante del moco que secretan las células epiteliales se compone de glucoproteínas, con un importante papel en la lubricación y protección de los tejidos que recubren los sistemas respiratorio y gastrointestinal. Muchas de las proteínas que las células segregan en fluidos extracelulares son glucoproteínas. Entre ellas se cuentan las hormonas que se encuentran en la sangre, tales como la hormona estimuladora del folículo, la hormona luteinizante y la gonadotropina coriónica; señalemos también las proteínas plasmáticas, tales como los orosomucoides, la ceruloplasmina, el plasminógeno, la protrombina y las inmunoglobinas (véase Apli. Clín. 9.1).

Las glucoproteínas contienen cantidades variables de glúcidos

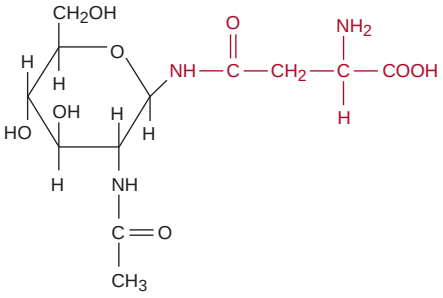
La cantidad de glúcido presente en las glucoproteínas es muy variable. Algunas de ellas, tales como la IgG, poseen una proporción en peso de glúcido reducida (4%), mientras que una glucoproteína de la membrana de los hematíes, la glucoforina, contiene un 60%. La glucoproteína de los quistes en los ovarios humanos se compone de un 70% de glúcido, y la glucoproteína gástrica humana contiene un 82% de glúcido. El glúcido puede distribuirse más o menos regularmente a lo largo de la cadena polipeptídica, o bien concentrarse en regiones concretas. Por ejemplo, en la glucoforina A humana, el glúcido se encuentra en la mitad amino terminal de la cadena polipeptídica que se sitúa en el exterior de la membrana celular.

Por lo general, el glúcido que se halla unido a uno o varios puntos de una cadena polipeptídica no posee más de 12 ó 15 residuos de azúcar. En algunas ocasiones, el componente glucídico se compone de un solo grupo monosacárido, tal como sucede en la glucoproteína de la glándula submaxilar (residuo único de *N*-acetil-α-D-galactosaminilo) y en algunos tipos de colágeno de mamíferos (residuo único de α-D-galactosilo). Las glucoproteínas suelen contener residuos de azúcar en

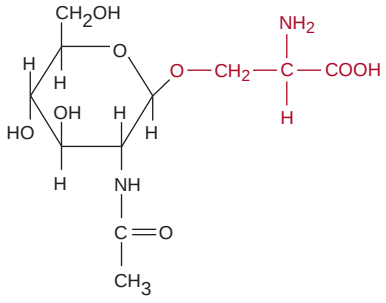
la forma D, salvo en los casos de la L-fucosa, la L-arabinosa y el ácido L-idurónico. Una glucoproteína procedente de diversas especies animales suele poseer una estructura primaria idéntica para el componente proteico, pero componentes glucídicos diferentes. Esta heterogeneidad puede llegar a producirse dentro de un mismo organismo. Por ejemplo, las formas A y B de la ribonucleasa pancreática poseen la misma secuencia de aminoácidos y una especificidad cinética similar hacia los sustratos, pero presentan múltiples diferencias en su composición glucídica.

Los glúcidos se unen covalentemente a las glucoproteínas mediante enlaces *N*- u *O*-glucosídicos

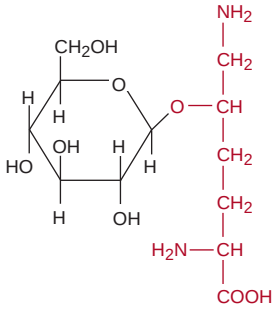
Hasta el momento actual, sólo se han elucidado completamente las estructuras de unos pocos componentes oligosacáridos. La microheterogeneidad de las glucoproteínas, proveniente de una síntesis incompleta o una degradación parcial, hace que los análisis estructurales sean extremadamente difíciles. No obstante, han aparecido ciertas generalidades acerca de la estructura de las glucoproteínas. El enlace covalente de los azúcares con la cadena peptídica constituye una parte central de la estructura de la glucoproteína, y sólo se han hallado un número limitado de enlaces (véase Capítulo 3). Tal como se muestra en la Figura 15.10 y en la Figura 3.45 (véase p. 132), los tres tipos principales de **enlaces glucopeptídicos** son *N*-glucosilo



Tipo I Enlace *N*-glucosilo con asparagina



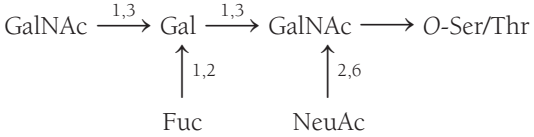
Tipo II Enlace *O*-glucosilo con serina



Tipo III Enlace *O*-glucosilo con 5-hidroxilisina

FIGURA 15.10
Estructura de los tres principales enlaces glucopeptídicos.

con **asparagina** (Asn), *O*-glucosilo con **serina** (Ser) o **treonina** (Thr) y *O*-glucosilo con **5-hidroxilisina**. Este último enlace, que se encuentra con las cadenas laterales glucídicas, bien de una galactosa simple, bien del disacárido glucosilgalactosa unidos covalentemente a hidroxilisina, sólo se encuentra prácticamente en el colágeno. Los otros dos enlaces se encuentran en una amplia serie de glucoproteínas. De los tres tipos principales, sólo el enlace *O*-glucosídico con serina o treonina es lábil a la hidrólisis alcalina. Con este procedimiento, se liberan dos tipos de oligosacáridos (simple y complejo). El examen de la clase simple de las mucinas submaxilares porcinas revela algunos rasgos estructurales generales. Existe una estructura central que consiste en galactosa (Gal) unida con enlace $\beta(1 \rightarrow 3)$ a la *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), que a su vez está unida por enlace *O*-glucosídico a residuos serina o treonina. En los extremos no reductores de esta clase de glucopéptidos se encuentran residuos de L-fucosa (Fuc), ácido siálico (NeuAc) y otra *N*-acetilgalactosamina. La estructura general de este tipo de glucopéptido es la siguiente:

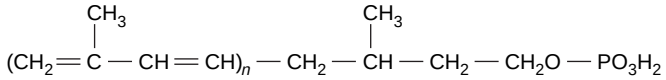


También se encuentran unidos al péptido, vía serina o treonina, heterosacáridos más complejos como por ejemplo las sustancias de los grupos sanguíneos. El estudio de estos determinantes ha demostrado la complejidad y variabilidad de estas estructuras, la forma como se forman los oligosacáridos de las superficies celulares y cómo este patrón de formación está determinado genéticamente. En la Apli. Clín. 15.8, se da un ejemplo de cómo las estructuras oligosacáridas de la superficie del eritrocito determinan la especificidad del grupo sanguíneo. También se han vislumbrado ciertos rasgos estructurales comunes en los oligosacáridos unidos por enlace *N*-glucosídico a la asparagina. Estas glucoproteínas tienen frecuentemente una estructura central formada por residuos de manosa (Man) unidos a *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) en la estructura siguiente:

La diversidad estructural de las glucoproteínas unidas a través de enlace *N*-glucosídico se debe a un amplio repertorio de subtipos de *N*-glucanos de alto contenido en manosa, híbridos y complejos.

La síntesis de glucoproteínas con enlaces *N* requiere dolicol fosfato

A diferencia de la síntesis de glucoproteínas unidas de forma *O*-glucosídica, la cual implica la acción secuencial de una serie de glucosiltransferasas, la síntesis de glucoproteínas unidas de forma *N*-glucosídica, supone un mecanismo algo diferente y más complejo (Figura 15.11). El núcleo común se ensambla previamente, antes de su incorporación al polipéptido, en forma de **oligosacárido unido a lípido** en el lado citosólico del RE. Durante la síntesis, los intermedios oligosacáridos están unidos a derivados del **dolicol fosfato**.



Dolicol fosfato

Los dolicoles son poliprenoles (C_{80}–C_{100}) que contienen entre 16 y 20 unidades de isopreno con la unidad final de isopreno saturada. En la síntesis de los oligosacáridos núcleo, estos lípidos participan en dos tipos de reacciones. La primera reacción supone la formación de un *N*-acetilglucosaminilpirofosforildolicol, unida a la liberación de UMP desde el azúcar unido a nucleótido respectivo. El segundo tipo de reacción, la de las transferasas de *N*-acetilglucosamina y manosa, tiene lugar mediante transferencia de azúcar desde el nucleótido sin formación de intermedios. La posterior adición de unidades de manosa se realiza también mediante un mecanismo ligado al dolicol. En el paso final, se transfiere el oligosacárido desde el dolicol pirofosfato a un residuo de asparagina de la cadena polipeptídica.

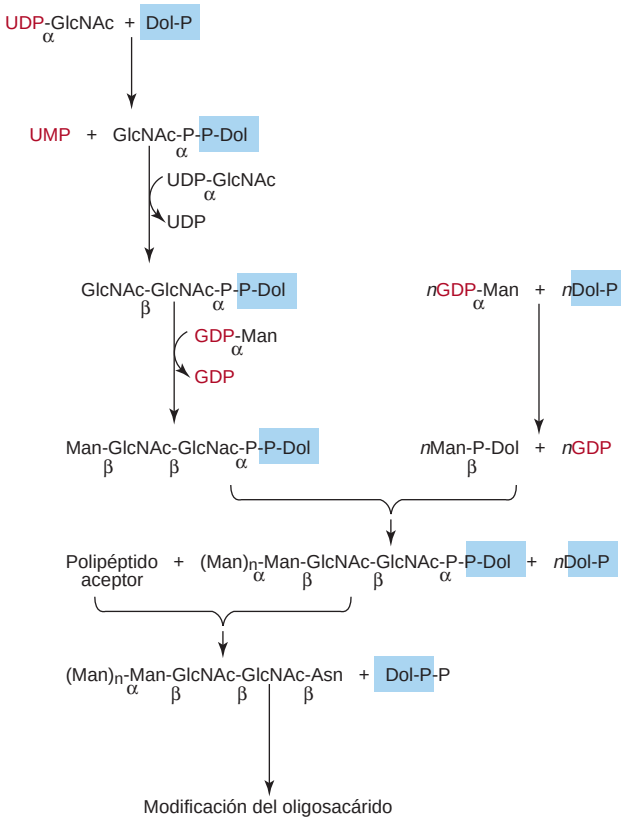
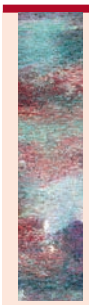


FIGURA 15.11
Biosíntesis del núcleo oligosacárido en las glucoproteínas con enlace asparagina-*N*-acetilgalactosamina.
Abreviatura: Dol, dolicol

Después de la síntesis de la región central específica, las cadenas de oligosacáridos se completan por acción de glucosiltransferasas y sin más participación de intermedios lipídicos. Una serie de reacciones iniciales de maduración, que se encuentran muy conservadas entre especies de vertebrados y tipos celulares, tienen lugar principalmente en el RE y parecen estar acopladas con el plegamiento adecuado de la proteína a la que está unido el glucano de forma covalente. Después del recorte inicial y liberación del RE, los *N*-glucanos experimentan otras modificaciones por glucosidasas y glucosiltransferasas, la mayor parte en el Golgi. En la ruta de maduración existen varios caminos que determinan la diversidad final de la estructura del glucano (a saber, subtipos alto contenido en manosa, híbrido o complejo) así como el destino final de las glucoproteínas. Por ejemplo, en ciertas glucoproteínas, el *N*-glucano $Man_8GlcNAc_2$-Asn se modifica por adición de un residuo GlcNAc catalizada por una GlcNAc-fosfotransferasa y posterior eliminación mediante GlcNAc fosfodiéster glucosidasa, dejando expuesto un residuo Man-6-P. Esta modificación clave es el determinante estructural que dirige algunas glucoproteínas al compartimiento lisosómico y forma la base de la enfermedad de almacenamiento lisosósmico conocida como enfermedad de la célula I (véase Apli. Clín. 15.9).

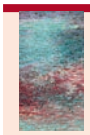
Al igual que la síntesis de heterooligosacáridos requiere glucosiltransferasas específicas, la degradación requiere glucosidasas específicas. Las exoglucosidasas eliminan azúcares de forma secuencial a partir del extremo no reductor, exponiendo el sustrato a la acción de la siguiente glucosidasa. La ausencia de una glucosidasa determinada impide la acción del siguiente enzima, lo que da lugar a la detención del catabolismo y a la acumulación del producto (Apli. Clín. 15.10). Existen también endoglucosidasas de más amplia especificidad, y la acción de endo- y exoglucosidasas tiene como resultado el catabolismo de las glucoproteínas. Una buena parte de las cadenas de glucano con unión *N*- u *O*- se encuentran tanto en glucoproteínas como en glucolípidos; de ahí que ciertos defectos enzimáticos puedan afectar a la degradación de ambos tipos de glucoconjugados mientras que otros parecen ser de glucoconjugado específico (véase Apli. Clín. 15.11).



APLICACIÓN CLÍNICA 15.9

Marcador glucídico común de destinación lisosómica y enfermedad de la célula I

La enfermedad de la célula I, así llamada por los grandes cuerpos de inclusión observados en las células de pacientes cultivadas, se caracteriza por rasgos clínicos y radiológicos graves que incluyen dislocaciones congénitas, deformidades torácicas, hernia, movilidad restringida de las articulaciones y desarrollo psicomotor retrasado. Esta rara y fatal enfermedad congénita proporcionó la primera conexión entre biosíntesis de glucoproteínas y enfermedad humana. En esta condición la función lisosómica es defectuosa porque el contenido de hidrolasa ácida es bajo debido a un defecto en la maduración de las hidrolasas ácidas glucoproteicas impidiendo que se genere el residuo Man-6-P. Sin este marcador específico, las hidrolasas ácidas no están marcadas para su destinación final, los lisosomas, secretándose al medio extracelular. Se ha encontrado en la mayoría de pacientes que la GlcNAc fosfotransferasa que une el residuo de manosa 6-fosfato era defectuosa lo que ilustra de manera gráfica el poder de la maduración de la glucoproteína para dirigir el tráfico proteico intracelular.



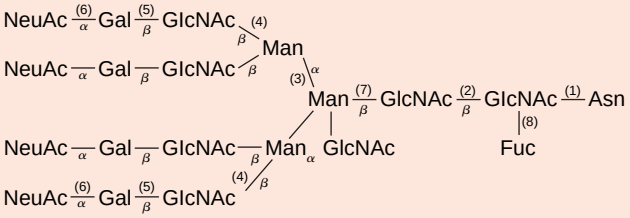
APLICACIÓN CLÍNICA 15.10
Aspartilglucosilaminuria: ausencia de 4-L-aspartilglucosamina amidohidrolasa

Existe un grupo de errores congénitos del metabolismo humano que afectan al almacenamiento de los glucolípidos, glucopéptidos, mucopolisacáridos y oligosacáridos. Estas enfermedades son causadas por defectos en la actividad glucosidasa lisosómica, lo que impide el catabolismo de los oligosacáridos. Los trastornos implican la acumulación gradual en los tejidos y en la orina de compuestos derivados de la degradación incompleta de los oligosacáridos, y pueden verse acompañados de anormalidades esqueléticas, hepatoesplenomegalia, cataratas, o retraso mental. Un trastorno que resulta de un defecto en el catabolismo de los oligosacáridos unidos por asparagina-*N*-acetilglucosamina es la aspartilglucosilaminuria. Una deficiencia en el enzima 4-L-aspartilglucosamina amidohidrolasa permite la acumulación de estructuras unidas por aspartilglucosamina (véase tabla adjunta). Se han descrito otros trastornos que implican la acumulación de oligosacáridos derivados tanto de glucoproteínas como de glucolípidos, que pueden compartir estructuras oligosacáridas comunes (véanse tabla y Apli. Clín. 15.11).

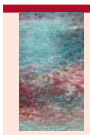
Defectos enzimáticos en la degradación de glucoproteínas tipo Asn-GlcNAc[a]

Enfermedad	*Enzima deficiente[b]*
Aspartiglucosilaminuria	4-L-Aspartilglucosilamina aminohidrolasa (2)
β-Manosidosis	β-Manosidasa (7)
α-Manosidosis	α-Manosidasa (3)
Gangliosidosis GM_2 variante O (Enfermedad de Sandhoff–Jatzkewitz)	β-*N*-acetilhexosaminidasas (A y B) (4)
Gangliosidosis GM_1	β-Galactosidasa (5)
Mucolipidosis I (sialidosis)	Sialidasa (6)
Fucosidosis	α-Fucosidasa (8)

[a]Estructura de oligosacárido Asn-GlcNAc típica.



[b]Los números entre paréntesis se refieren a los enzimas que hidrolizan este enlace



APLICACIÓN CLÍNICA 15.11
Enfermedades de glucolípidos

Un gran número de enfermedades genéticas humanas provienen de deficiencias en hidrolasas, que actúan de forma predominante sobre sustratos glucolípidos, que dan lugar a la acumulación de glucolípidos y productos gangliosídicos. Los síntomas clínicos de las enfermedades asociadas con cada uno de los glucoconjugados pueden variar muchísimo. Sin embargo, debido a la preponderancia de lípidos en el sistema nervioso, los defectos que afectan a la degradación de glucolípidos están asociados frecuentemente con neurodegeneración y deterioro mental y motor graves.

Defectos enzimáticos en la degradación de glucolípidos

Enfermedad	*Enzima defectuoso*
Tay–Sachs	β-Hexosaminidasa A
Sandhoff	β-Hexosaminidasas A y B
Gangliosidosis GM_1	β-Galactosidasa
Sialidosis	Sialidasa
Fabry	α-Galactosidasa
Gaucher	β-Glucoceramidasa
Krabbe	β-Galactoceramidasa
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A (cerebrósido sulfatasa)

15.6 PROTEOGLUCANOS

Además de las glucoproteínas, que normalmente contienen proporcionalmente menos glúcido que proteína en peso, existe otra clase de macromoléculas complejas, que contienen hasta un 95% o más de glúcido. Las propiedades de estos compuestos se parecen más a las de los polisacáridos que a las de las proteínas. Para distinguir estos compuestos de otras glucoproteínas se los denomina **proteoglucanos**, y **glucosaminoglucanos** a sus cadenas glucídicas. Aún se hace uso del antiguo nombre de **mucopolisacáridos**, especialmente en referencia al grupo de enfermedades

de almacenamiento, mucopolisacaridosis, que aparecen como consecuencia de la incapacidad de degradar estas moléculas (véase Apli. Clín. 15.13).

Los proteoglucanos son sustancias polianiónicas de elevada masa molecular que están compuestas por muchas cadenas diferentes de glucosaminoglucanos unidas covalentemente a un núcleo proteico. Aunque en la actualidad se conocen seis clases distintas de glucosaminoglucanos, existen ciertas características comunes a todas ellas. Las largas cadenas heteropolisacáridas lineales están formadas en gran parte por unidades repetitivas de disacárido en el que un azúcar es una hexosamina y el otro es un ácido urónico. Otros constituyentes comunes de los glucosaminoglucanos son los grupos sulfato unidos mediante enlace éster a ciertos monosacáridos o mediante enlace amida al grupo amino de la glucosamina. No obstante, el hialuronato no está sulfatado y no está unido covalentemente a una proteína. Los grupos carboxilo de los ácidos urónicos y los grupos sulfato contribuyen a la naturaleza de polianiones altamente cargados de los glucosaminoglucanos. Tanto su carga eléctrica como su estructura macromolecular contribuyen a su papel biológico como lubricantes y elementos de sostén en el tejido conjuntivo. Los glucosaminoglucanos son, predominantemente, componentes de las matrices extracelulares y de las superficies celulares. Cada vez se elucidan papeles más dinámicos en la adhesión celular y en la señalización así como en muchas más actividades biológicas.

El hialuronato es un copolímero de *N*-acetilglucosamina y ácido glucurónico

Entre los glucosaminoglucanos el **hialuronato** es muy diferente de los otros cinco tipos. No está sulfatado, no está unido covalentemente a una proteína, y es el único glucosaminoglucano que no está limitado a los tejidos animales, sino que también es producido por bacterias. Se le clasifica como glucosaminoglucano debido a su parecido estructural con estos otros polímeros, ya que consiste únicamente en unidades repetitivas disacáridas de *N*-acetilglucosamina y ácido glucurónico (Figura 15.11). Aunque el hialuronato tiene la estructura química menos compleja de todos los glucosaminoglucanos, las cadenas pueden alcanzar masas moleculares de 10^5 a 10^7. La elevada masa molecular, el carácter de polielectrolito y el gran volumen que ocupa en solución contribuyen a las propiedades del ácido hialurónico como lubricante y amortiguador de golpes. De ahí que se encuentre predominantemente en el líquido sinovial, humor vítreo y cordón umbilical.

Los condroitina sulfatos son los glucosaminoglucanos más abundantes

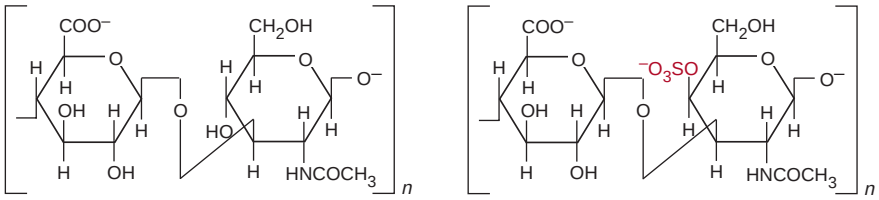
Los glucosaminoglucanos más abundantes en el cuerpo son los **condroitina sulfatos**. Las cadenas polisacáridas están unidas a residuos específicos de serina de una proteína central de una masa molecular variable mediante una región de unión tetrasacárida.

$$\text{GlcUA} \xrightarrow[1,3]{} \text{Gal} \xrightarrow[1,3]{} \text{Gal} \xrightarrow[1,4]{} \text{Xyl} \longrightarrow \textit{O}\text{-Ser}$$

Las unidades repetitivas disacáridas características formadas por *N*-acetilgalactosamina y ácido glucurónico están unidas covalentemente a esta región de unión (Figura 15.12). Los disacáridos pueden estar sulfatados en la posición 4 o en la 6 de la *N*-acetilgalactosamina. Cada cadena polisacárida contiene entre 30 y 50 de estas unidades disacáridas, a lo que corresponde una masa molecular de 15 000 a 25 000 Da. Una molécula promedio del proteoglucano condroitina sulfato tiene aproximadamente 100 cadenas de condroitina sulfato unidas al núcleo proteico, lo que da lugar a una masa molecular de 1,5 a 2×10^6 Da. Las preparaciones de proteoglucano son, sin embargo, extremadamente heterogéneas, difiriendo en la longitud de la proteína central, grado de sustitución, distribución de las cadenas polisacáridas, longitud de las cadenas de condroitina sulfato y grado de sulfatación. Se ha demostrado que los condroitina sulfato proteoglucanos se agregan de modo no covalente con hialuronato, formando estructuras mucho mayores. Son componentes mayoritarios del cartílago, tendón, ligamentos y aorta, y también se han aislado de cerebro, riñon y pulmón.

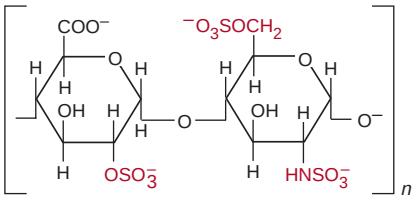
El dermatán sulfato contiene ácido L-idurónico

El **dermatán sulfato** se diferencia de los condroitina 4 y 6 sulfatos en que su ácido urónico predominante es el ácido L-idurónico, aunque el ácido D-glucurónico tam-

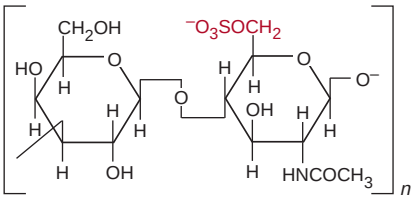


Unidad repetitiva del ácido hialurónico

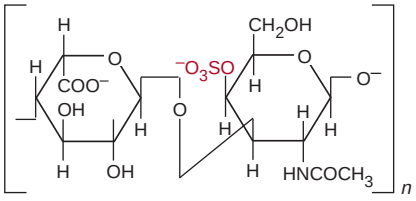
Unidad repetitiva de la condroitina 4-sulfato



Unidad repetitiva de la heparina



Unidad repetitiva del queratán sulfato



Unidad repetitiva del dermatán sulfato

FIGURA 15.12
Principales unidades repetitivas en las cadenas de glucosaminoglucanos.

bién está presente en cantidades variables. Los enlaces glucosídicos son los mismos en posición y configuración que en los condroitina sulfatos, con cadenas polisacáridas medias de masas moleculares entre 2 y 5 × 10^4 Da. A diferencia de los condroitina sulfatos, el dermatán sulfato es antitrombósico como la heparina, pero contrariamente a la heparina, muestra unas actividades anticoagulantes de sangre total y de clarificación de lípidos sanguíneos mínimas. Como macromolécula del tejido conjuntivo, el dermatán sulfato se encuentra en la piel, vasos sanguíneos y válvulas del corazón.

La heparina y el heparán sulfato difieren de otros glucosaminoglucanos

En la **heparina** la unidad repetitiva disacárida característica está formada, como en el dermatán sulfato, por glucosamina y ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico (Figura 15.12). A diferencia de la mayor parte de los restantes glucosaminoglucanos, la heparina contiene enlaces α-glucosídicos. Casi todos los residuos glucosamina contienen enlaces sulfamida, mientras que un número menor de residuos glucosamina están *N*-acetilados. Aunque variable, el contenido en sulfato de la heparina se acerca en las preparaciones con mayor actividad biológica a 2,5 residuos sulfato por unidad disacárida. Además del *N*-sulfato y el *O*-sulfato sobre el C-6 de la glucosamina, la heparina también puede contener sulfato sobre el C-3 de la hexosamina y el C-2 del ácido urónico. Contrariamente a otros glucosaminoglucanos, la heparina es un componente intracelular de los mastocitos y funciona predominantemente como anticoagulante y agente clarificante de lípidos (véase Apli. Clín. 15.12).

El **heparán sulfato** contiene una unidad repetitiva disacárida similar, pero tiene más grupos *N*-acetilo, menos grupos *N*-sulfato y un grado menor de grupos *O*-sulfato. El heparán sulfato puede ser extracelular o un componente integral y ubicuo de la superficie celular en muchos tejidos, como las paredes de los vasos sanguíneos, amiloide y cerebro.

APLICACIÓN CLÍNICA 15.12
La heparina es un anticoagulante

La heparina es un polisacárido sulfatado que se encuentra en la naturaleza y que se utiliza para reducir la tendencia a la coagulación de los pacientes. Tanto *in vivo* como *in vitro*, la heparina impide la activación de los factores de la coagulación, aunque no actúa directamente sobre ellos. La actividad anticoagulante de la heparina es más bien el resultado de su interacción con un inhibidor del proceso de la coagulación, al unirse a éste. Posiblemente, la fijación de la heparina induce un cambio conformacional en el inhibidor, lo que genera una interacción complementaria entre el inhibidor y el factor de coagulación activado, impidiendo de este modo que el factor participe en el proceso de la coagulación. El inhibidor que interacciona con la heparina es la antitrombina III, un inhibidor proteico plasmático de serina proteasas. En ausencia de heparina, la antitrombina III se combina lentamente (10–30 minutos) con varios factores de coagulación, formando complejos sin actividad proteolítica. En presencia de heparina, los complejos inactivos se forman en unos pocos segundos. La antitrombina III contiene un residuo de arginina que se combina con la serina del centro activo de los factores Xa y IXa; por lo tanto, la inhibición es estequiométrica. La deficiencia heterozigótica de antitrombina III aumenta el riesgo de padecer trombosis en las venas y la resistencia a la acción de la heparina.

El queratán sulfato existe en dos formas

El **queratán sulfato** está compuesto principalmente por una unidad repetitiva disacárida de *N*-acetilglucosamina y galactosa, y no existe ácido urónico en la molécula (Figura 15.12). El contenido en sulfato es variable, pudiendo estar presente un éster sulfato en el C-6 tanto de la galactosa como de la hexosamina. Se han hallado dos tipos de queratán sulfato que difieren en su contenido glucídico global y en su distribución tisular. Ambos contienen manosa, fucosa, ácido siálico y *N*-acetilgalactosamina como monosacáridos adicionales. El queratán sulfato I, aislado de la córnea, está unido a la proteína mediante un enlace *N*-acetilglucosamina–asparagina, típico de las glucoproteínas. El queratán sulfato II, aislado del cartílago, está unido a la proteína a través de un enlace *O*-glucosídico entre la *N*-acetilgalactosamina y serina o treonina. Los queratán sulfatos esqueléticos se encuentran a menudo unidos covalentemente a la misma proteína central que las cadenas de condroitina sulfato.

La biosíntesis de condroitina sulfato es característica de la formación de glucosaminoglucanos

Las cadenas heteropolisacáridas de los proteoglucanos se forman por acción secuencial de una serie de glucosiltransferasas que catalizan la transferencia de un monosacárido desde un azúcar unido a nucleótido a un aceptor adecuado, siendo éste bien el extremo no reductor de otro azúcar, bien un polipéptido. Dado que la biosíntesis mejor conocida es la de los **condroitina sulfatos**, será esta la vía que se abordará como prototipo de la formación de glucosaminoglucanos (Figura 15.13).

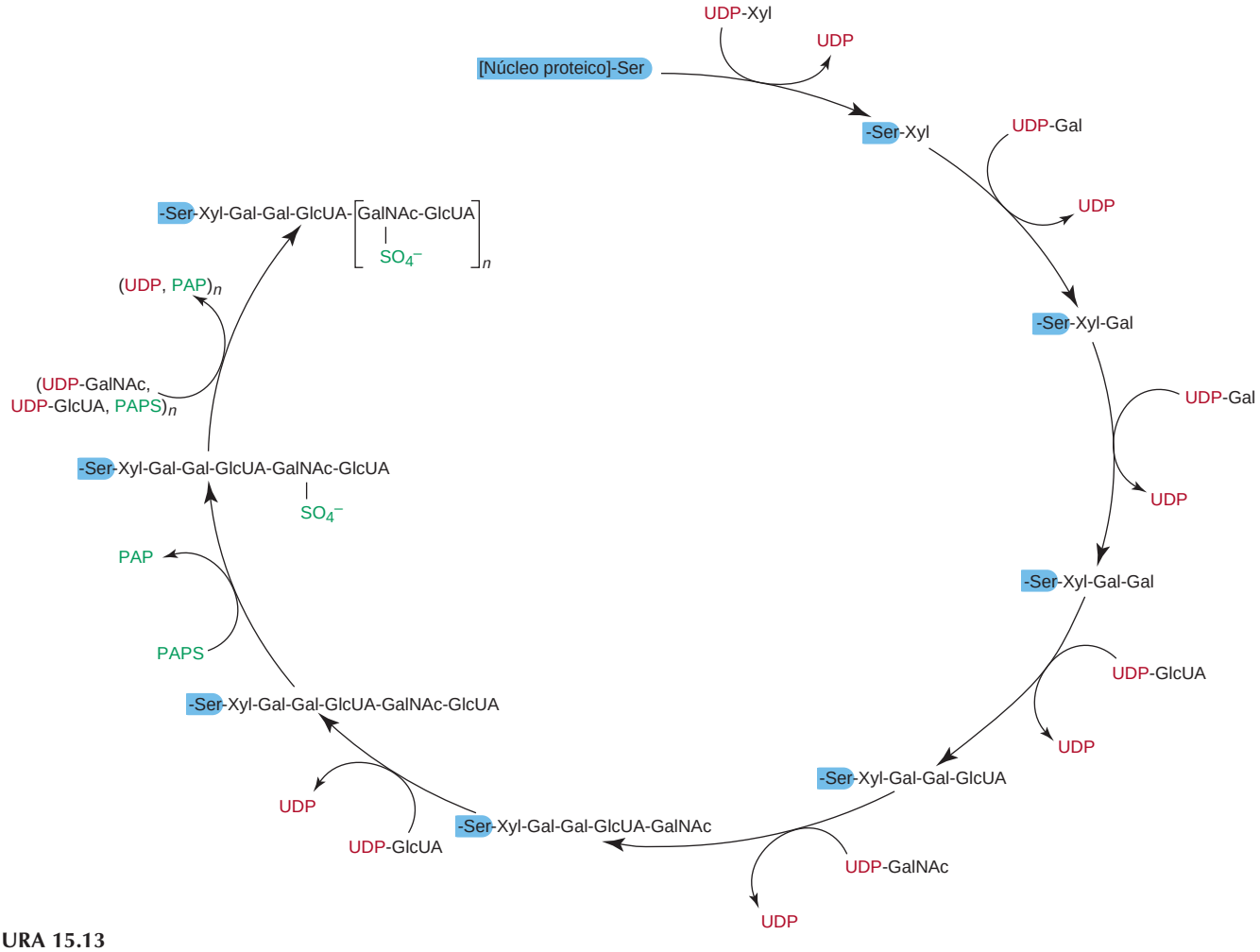


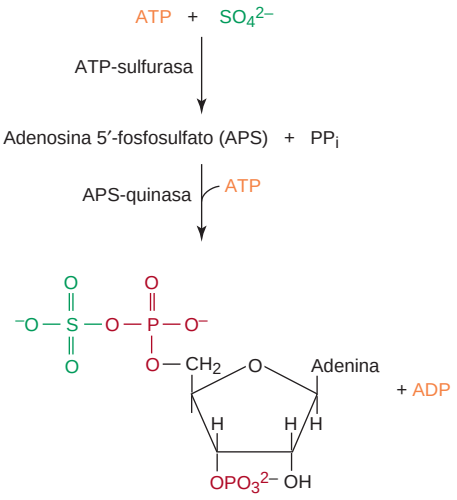
FIGURA 15.13
Síntesis del proteoglucano condroitina sulfato.
Abreviaturas: Xyl, xilosa; Gal, galactosa; GlcUA, ácido glucurónico; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina; PAPS, 3′-fosfoadenosina 5′-fosfosulfato.

El primer paso del proceso es la formación de la proteína central del proteoglucano condroitina sulfato, seguido de la formación de las cadenas polisacáridas catalizado por seis glucosiltransferasas diferentes. Se requiere una especificidad de sustrato estricta para completar la región singular de unión tetrasacárida. La polimerización se produce seguidamente por la acción concertada de dos glucosiltransferasas, una *N*-acetilgalactosaminiltransferasa y una glucuronosiltransferasa, que adicionan de modo alternativo los dos monosacáridos, formando así las unidades repetitivas disacáridas características. La sulfatación de *N*-acetilgalactosamina, en la posición 4 o en la 6, es simultánea al alargamiento de la cadena. El dador de sulfato es, al igual que en otros sistemas biológicos, el 3′-fosfoadenosina 5′-fosfosulfato (PAPS), formado a partir del ATP y sulfato en dos pasos (Figura 15.14). La importancia de la sulfatación para la función de los proteoglucanos se pone de relieve por la preponderancia de condiciones condrodistróficas en animales y humanos como resultado del proceso de sulfatación (Apli. Clín. 15.13).

La síntesis de los otros glucosaminoglucanos requiere transferasas específicas adicionales para los azúcares y enlaces hallados en estas moléculas. La finalización de estos glucosaminoglucanos supone a menudo, además de la *O*-sulfatación, otras modificaciones, entre las que se cuentan la epimerización, la acetilación y la *N*-sulfatación. Es interesante observar que la epimerización del ácido D-glucurónico a ácido L-idurónico se produce después de la incorporación a la cadena polimérica, y tiene lugar simultáneamente al proceso de sulfatación.

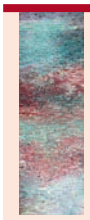
La síntesis tanto de los proteoglucanos como de las glucoproteínas está regulada por el mismo mecanismo, a nivel de la síntesis de hexosaminas. La reacción de la fructosa 6-fosfato–glutamina transamidasa (Figura 15.4), está sujeta a retroinhibición por la UDP-*N*-acetilglucosamina, la cual a su vez está en equilibrio con la UDP-*N*-acetilgalactosamina. De un modo más específico, en la síntesis de proteoglucanos los niveles de UDP-xilosa y ácido UDP-glucurónico están estrictamente controlados por la inhibición, debida a la UDP-xilosa, de la conversión de UDP-glucosa a ácido UDP-glucurónico por la UDP-glucosa deshidrogenasa (Figura 15.4). Dado que la xilosa es el primer azúcar adicionado durante la síntesis de condroitina sulfato, dermatán sulfato, heparina y heparán sulfato, el primer efecto de la disminución de la síntesis de proteína central sería la acumulación de UDP-xilosa, lo que ayuda a mantener un equilibrio entre la síntesis de las porciones de proteína y de polisacárido de estas macromoléculas complejas.

Los proteoglucanos, al igual que las glucoproteínas, se degradan por la acción secuencial de proteasas y **glucosidasas**, además de **desacetilasas** y **sulfatasas**. Gran parte de la información sobre el metabolismo y degradación de proteoglucanos se deriva del estudio de las **mucopolisacaridosis** (Apli. Clín. 15.14). Este grupo de enfermedades genéticas humanas se caracteriza por la acumulación en los tejidos y



3′-Fosfoadenosina 5′-fosfosulfato (PAPS)

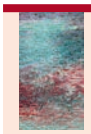
FIGURA 15.14
Biosíntesis del 3′-fosfoadenosina 5′-fosfosulfato (PAPS).



APLICACIÓN CLÍNICA 15.13
Condrodistrofias debidas a defectos de sulfatación

La sulfatación es una modificación esencial de los glucosaminoglucanos, los disacáridos repetitivos unidos a proteínas centrales en las diversas familias de proteoglucanos. El proceso global de sulfatación es complejo, y en él están implicados múltiples componentes y múltiples compartimientos celulares: transporte de sulfato inorgánico al interior de la célula mediante transportadores de membrana, transformación en fosfoadenosilfosfosulfato (PAPS) a través de un proceso de dos pasos catalizado por la PAPS sintetasa en el citosol y, a continuación, utilización directa por las sulfotransferasas citosólicas o transporte del PAPS desde el citosol al complejo de Golgi para su utilización por una serie de sulfotransferasas luminales. Se conocen tres enfermedades autosómicas recesivas, displasia diastrófica (DTD), atelosteogénesis tipo II (AOII) y acondrogénesis tipo IB (ACG-1B) que son resultado de diferentes mutaciones en el gen *DTDST* que codifica un transportador de sulfato. Los pacientes con DTD tienen una talla desproporcionadamente baja y displasia articular generalizada pero, normalmente, sobreviven con una longevidad normal; la AOII constituye una condrodisplasia perinatal letal; la ACG-1B se caracteriza por un tronco y extremidades muy cortos.

Se han identificado enfermedades genéticas que son debidas a defectos en el siguiente paso de la ruta, la síntesis de PAPS por la sulfurilasa/quinasa bifuncional (PAPS sintetasa) tanto en animales (p. ej. el ratón braquimórfico que muestra un defecto grave del crecimiento que da lugar a un tronco y extremidades sumamente cortos y un cráneo pequeño) y en el hombre (p. ej., displasia espondiloepimetafísea (tipo paquistaní) caracterizada por miembros cortos y arqueados, articulaciones de la rodilla agrandadas y una aparición temprana de enfermedad de las articulaciones degenerativa). Estas mutaciones identificadas en los diversos componentes del proceso de sulfatación ponen claramente de relieve la importancia de esta modificación postraducción para el funcionamiento de los proteoglucanos, especialmente en el desarrollo y mantenimiento del sistema esquelético.



APLICACIÓN CLÍNICA 15.14
Mucopolisacaridosis

Existe un grupo de enfermedades humanas genéticas caracterizadas por una acumulación y excreción excesivas de los oligosacáridos de los proteoglucanos, y a las que se denomina colectivamente, mucopolisacaridosis. Estas enfermedades resultan de una deficiencia de una o más hidrolasas lisosómicas, que son las responsables de la degradación del dermatán sulfato y/o del heparán sulfato. Los enzimas ausentes en algunas mucopolisacaridosis específicas, y que han podido ser identificados se presentan en la tabla adjunta.

Aunque la base química para este grupo de enfermedades es similar, sí pueden variar sus manifestaciones clínicas y su forma de transmisión hereditaria. Los síndromes de Hurler y de Sanfilippo se transmiten en forma autosómica recesiva, mientras que la enfermedad de Hunter está ligada al cromosoma X. Tanto el síndrome de Hurler como la enfermedad de Hunter se caracterizan por anormalidades esqueléticas y retraso mental que, en casos graves, pueden conducir a muerte temprana. Por el contrario, en el síndrome de Sanfilippo, los defectos físicos son relativamente leves, mientras que el retraso mental es grave. La incidencia de todas las mucopolisacaridosis en conjunto es de una por cada 30 000 nacimientos.

Además de las señaladas en la tabla, existen algunas otras enfermedades. La deficiencia de sulfatasa múltiple (MSD) se caracteriza por la actividad disminuida de todas las sulfatasas conocidas. Resultados recientes sugieren que es necesaria una modificación co- o postraducción de una cisteína a ácido 2-amino 3-oxopropiónico para las sulfatasas activas, y que la falta de esta modificación provoca MSD. Estas enfermedades pueden ser diagnosticadas prenatalmente ya que el patrón metabólico de células afectadas obtenidas del líquido amniótico difiere considerablemente del de las células normales.

Defectos enzimáticos en las mucopolisacaridosis

Enfermedad	*Productos acumulados*[a]	*Enzima deficiente*[b]
Hunter	Heparán sulfato Dermatán sulfato	Iduronato sulfatasa (1)
Hurler–Scheie	Heparán sulfato Dermatán sulfato	α-L-Iduronidasa (2)
Maroteaux–Lamy	Dermatán sulfato	*N*-acetilgalactosamina sulfatasa (3)
Mucolipidosis VII	Heparán sulfato Dermatán sulfato	β-Glucuronidasa (5)
Sanfilippo A	Heparán sulfato	Heparán sulfamidasa (6)
Sanfilippo B	Heparán sulfato	*N*-Acetilglucosaminidasa (9)
Sanfilippo C	Heparán sulfato	Acetil CoA: α-glucosaminida acetiltransferasa
Sanfilippo D	Heparán sulfato	*N*-Acetilglucosamina 6-sulfatasa (8)
Morquio A	Queratán/condroitina sulfato	Galactosa-6-sulfatasa
Morquio B	Queratán sulfato	β-Galactosidasa

[a]Estructuras del dermatán sulfato y del heparán sulfato.

Dermatán sulfato —IdUA α(2)(1)OSO_3H GalNAc β(4)(3)OSO_3H GlcUA β(4) GalNAc β OSO_3H—

Heparán sulfato —IdUA α(2)(1)OSO_3H GlcN α(7)(6)OSO_3H GlcUA β(5) GlcNAc α(9)(8)OSO_3H

[b]Los números entre paréntesis se refieren a los enzimas que hidrolizan esos enlaces.

la excreción en la orina de productos oligosacáridos derivados de la rotura incompleta de los proteoglucanos, lo que es debido a la carencia de una o más hidrolasas lisosómicas. En las enfermedades en las que se ha identificado el defecto bioquímico, se acumula un producto con un extremo no reductor, que hubiera sido el sustrato del enzima ausente.

Aunque se continúan definiendo los proteoglucanos de acuerdo con la cadena de glucosaminoglucano que contienen, cada vez más se están definiendo nuevos proteoglucanos en base principalmente a sus propiedades funcionales o su localización. Las especies extracelulares predominantes son el **agrecán** y **versicán**; el sindecán, CD44 y trombomodulina son proteínas integrales de membrana; el **neurocán, brevicán, cerebrocán** y **fosfacán** están preferentemente restringidos al sistema nervioso. Muchos proteoglucanos (como por ejemplo agrecán, sindecán y betaglucán) poseen dos tipos de cadenas de glucosaminoglucano cuyo tamaño y proporción relativa pueden variar en función del desarrollo, la edad o enfermedades. Cada vez más se están clonando los genes que codifican las proteínas centrales de los proteoglucanos así como de los enzimas biosintéticos habiéndose descubierto que las proteínas pertenecen a familias de origen y posible función relacionados. De este modo, parece que la versátil estructura de estas abundantes moléculas que contienen glúcidos es bien explotada por las células en muchas formas aún por descubrir.

BIBLIOGRAFÍA

Dutton, G. J. (Ed.). *Glucuronic Acid, Free and Combined.* New York: Academic Press, 1966.

Ginsburg, V. y Robbins, P. (Eds.). *Biology of Carbohydrates.* New York: Wiley, 1984.

Horecker, B. L. *Pentose Metabolism in Bacteria.* New York: Wiley, 1962.

Hughes, R. C. *Glycoproteins.* London: Chapman and Hall, 1983.

Kornfeld, R. y Kornfeld, S. Assembly of Asn-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631, 1985.

Lennarz, W. J. (Ed.). *The Biochemistry of Glycoproteins.* New York: Plenum Press, 1980.

Menkes, J. A. Metabolic diseases of the nervous system. En: *Textbook of Child Neurology,* 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990, p. 28.

Nyhan, W. L. y Sakati, N. A. Mucopolysaccharidoses and related disorders. En: *Diagnostic Recognition of Genetic Disease.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1987, p. 371.

Schwartz, N. B., Lyle, S., Ozeran, J. D., Li, H., Deyrup, A. y Westley, J. Sulfate activation and transport in mammals: system components and mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 109:143, 1998.

Schwartz, N. B. y Domowicz, M. Proteoglycan gene mutations and impaired skeletal development. En *Skeletal Morphogenesis and Growth.* AAOS Publications, 1998, p. 413.

Schwartz, N. B., Pirok, E. W., Mensch, J. R. y Domowicz, M. S. Domain organization, genomic structure, evolution and regulation of expression of the aggrecan gene family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62:177, 1999.

Schwartz, N. B. Proteoglycans. En *Embryonic Encyclopedia of Life Sciences.* London: Nature Publishing Group, 2000. www.els.net

Schwartz, N. B. Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans. *Front. Biosci.* 5:649, 2000.

Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. y Valle, D. (Eds.). *The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Todas las interconversiones de monosacáridos (o derivados) siguientes requieren como intermediario un azúcar unido a un nucleótido EXCEPTO:
   A. galactosa 1-fosfato a glucosa 1-fosfato.
   B. glucosa 6-fosfato a manosa 6-fosfato.
   C. glucosa a ácido glucurónico.
   D. ácido glucurónico a xilosa.
   E. glucosamina-6-fosfato a ácido *N*-acetilneuramínico (un ácido siálico)

2. La forma grave de galactosemia:
   A. es una deficiencia genética de una uridililtransferasa que intercambia galactosa 1-fosfato por glucosa en la UDP-glucosa.
   B. es el resultado de la carencia de una epimerasa.
   C. no se manifiesta en el nacimiento, sino que sus síntomas se manifiestan más tarde.
   D. es la incapacidad de formar galactosa 1-fosfato.
   E. sería de esperar que interfiriese con la utilización de fructosa tanto como con la de galactosa, ya que el enzima deficiente es común al metabolismo de ambos azúcares.

3. Las siguientes afirmaciones sobre el ácido glucurónico son todas ciertas, EXCEPTO:
   A. es una molécula cargada a pH fisiológico.
   B. como UDP-derivado puede ser descarboxilado para formar un componente que se emplea en la síntesis de proteoglucano.
   C. es un precursor del ácido ascórbico en el hombre.
   D. su formación a partir de glucosa se encuentra sometida a control por retroalimentación por un intermediario unido a UDP.
   E. puede en último término ser convertido en xilulosa-5-fosfato y entrar en la ruta de las pentosas fosfato.

4. La conversión de fructosa 6-fosfato en glucosamina 6-fosfato:
   A. es una reacción de transaminación en la que el glutamato actúa como donador de nitrógeno.
   B. es estimulada por la UDP-*N*-acetilglucosamina.
   C. necesita que la fructosa 6-fosfato se una previamente a un nucleótido.
   D. es un primer paso en la formación de aminoazúcares *N*-acetilados.
   E. tiene lugar únicamente en el hígado.

5. Entre las funciones de las porciones glucídicas complejas de las glucoproteínas, se encuentran todas las siguientes EXCEPTO:
   A. determinantes del tipo sanguíneo.
   B. molde para la síntesis de glucosaminoglucanos.
   C. especificidad de los receptores de la superficie celular.
   D. determinante de la velocidad a la que se eliminan de la circulación ciertas moléculas.
   E. dirigir las células a determinados tejidos.

6. La fucosa y el ácido siálico:
   A. ambos son derivados de la UDP-*N*-acetilglucosamina.
   B. son las partes de la cadena glucídica que están unidas covalentemente a la proteína.
   C. pueden encontrarse en la estructura central de ciertas glucoproteínas con enlaces *O*-.
   D. son tranferidas a una cadena glucídica cuando ésta se encuentra unida al dolicol fosfato.
   E. constituyen la unidad repetitiva de los proteoglucanos.

7. Los glucosaminoglucanos:
   A. constituyen la porción glucídica de las glucoproteínas.
   B. están formados por grandes secciones de unidades repetitivas, formadas por lo común por una hexosamina y un ácido urónico.
   C. siempre contienen sulfato.
   D. se presentan solamente en dos formas.
   E. están unidos a la proteína por interacción iónica.

8. Todas las afirmaciones siguientes sobre los proteoglucanos son verdaderas EXCEPTO:
   A. la especificidad viene determinada, en parte, por la acción de glucosiltransferasas.
   B. la síntesis está regulada, en parte, por la inhibición mediante UDP-xilosa de la conversión de UDP-glucosa en ácido UDP-glucurónico.
   C. la síntesis implica la sulfatación de residuos glucídicos por acción del PAPS.
   D. la síntesis de la proteína central está equilibrada con la síntesis de las porciones polisacáridas.
   E. la degradación está catalizada en el citosol por glucosidasas inespecíficas.

Preguntas 9 y 10: Un paciente ingresó en el hospital con síntomas de anemia grave. La aparición de los síntomas tuvo lugar después de dos días de terapia con una sulfamida. Los resultados del laboratorio indicaron una cantidad de hemoglobina de 8,5 g/dL y una proporción [NADPH]/[$NADP^+$] anormalmente baja. Investigaciones posteriores condujeron al diagnóstico de un enzima defectuoso de la ruta de las pentosas fosfato.

9. En las células, la relación [$NADPH/NADP^+$] se mantiene en unos niveles elevados debido fundamentalmente a:
   A. lactato deshidrogenasa.
   B. la acción combinada de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la gluconolactonasa.
   C. la acción de la cadena de transporte electrónico.
   D. mecanismos de lanzadera tales como la lanzadera de la α-glicerol fosfato deshidrogenasa.
   E. las acciones combinadas de la transcetolasa y la transaldolasa.

10. Si una célula necesitara más NADPH que ribosa 5-fosfato:
   A. sólo tendría lugar la primera fase de la ruta de la pentosas fosfato.
   B. intermediarios glucolíticos circularían hacia la fase reversible de la ruta de las pentosas fosfato.
   C. tendrían lugar interconversiones de glúcidos, pero no liberación neta de carbonos de la glucosa 6-fosfato.
   D. el equivalente de los carbonos de la glucosa 6-fosfato se liberarían en forma de 6 CO_2.
   E la ruta de las pentosas fosfato sólo podría satisfacer parte de esta necesidad; el resto tendría que provenir de otras rutas.

Preguntas 11 y 12: Un bebé de seis meses presentaba hipoglucemia, vómitos, diarrea, enteropatía con pérdida de proteína y fibrosis hepática. La determinación del estado de glucosilación de la transferrina sérica endógena reveló la existencia de CDGS (síndrome de la glucoproteína con carencia de glúcido) tipo Ib, el cual es un defecto de la actividad fosfomanosa isomerasa.

11. El papel de la fosfomanosa isomerasa es la interconversión de:
   A. manosa 6-P en manosa 1-P
   B. glucosa 6-P en manosa 6-P
   C. fructosa 6-P en manosa 6-P
   D. fructosa 1-P en manosa 1-P
   E. glucosa 6-P en manosa 1-P

12. En la CDGS tipo Ic que se debe a un defecto en un enzima que transfiere un residuo glucosilo a un precursor dolicol pirofosfato de alto contenido en manosa, la estructura glucídica sería parte de un(a):
   A. glucoproteína unida por *N*-
   B. una glucoproteína unida por *O*-.
   C. proteoglucano.
   D. glucosaminoglucano
   E. lípido complejo.

Preguntas 13 y 14: Un recién nacido presentaba múltiples anormalidades esqueléticas siendo las más aparentes un tronco corto y extremidades cortas. La urina no contenía oligosacáridos parcialmente degradados ni oligosacáridos de proteoglucanos. La concentración de sulfato en sangre y de hidrolasa ácida extracelular eran normales.

13. La enfermedad descrita se debería muy probablemente a un defecto en:
   A. la capacidad de generar manosa 6-fosfato.
   B. la actividad glucosidasa lisosómica.
   C. el gen que codifica un transportador de sulfato.
   D. la PAPS sintetasa.
   E. una sulfatasa.

14. La sulfatación es un componente importante de la síntesis de:
   A. la mayoría de proteoglucanos.
   B. hialuronato.
   C. la mayoría de glucoproteínas.
   D. la bilirrubina conjugada.
   E. todos los anteriores.

Problemas

15. ¿De qué modo se convierte el exceso de ribosa 5-fosfato en intermediarios de la glucólisis? Asegúrese de incluir todos los enzimas implicados.

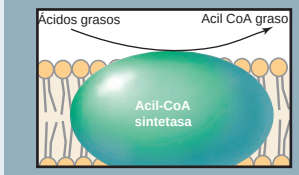
16. La fructosuria esencial es un defecto de la fructoquinasa mientras que la intolerancia a la fructosa es un defecto en la fructosa 1-fosfato aldolasa. ¿Cuál de estas dos enfermedades conduce a hipoglucemia grave después de ingestión de fructosa y por qué?

RESPUESTAS

1. **B** La glucosa y manosa fosfatos están en equilibrio con la fructosa 6-fosfato por acción de fosfohexosa isomerasas. A: Esto tiene lugar vía una epimerasa a nivel de UDP-galactosa. C y D: Esta oxidación de la glucosa está catalizada por la UDP-glucosa deshidrogenasa y el producto puede ser descarboxilado a UDP-xilosa. e: Nuevamente, tiene lugar una epimerización en el nucleótido intermediario.
2. **A** B: La epimerasa es normal. C: La galactosa es un azúcar de gran importancia para los recién nacidos. D: En esta enfermedad la galactoquinasa es normal pero es deficiente en la forma leve de la enfermedad. E: El metabolismo de la fructosa no utiliza la uridililtransferasa cuya carencia provoca la galactosemia.
3. **C** El hombre no fabrica ácido ascórbico. A: El grupo ácido cargado incrementa la hidrosolubilidad que es uno de los principales papeles fisiológicos del ácido glucurónico, por ejemplo en el metabolismo de la bilirrubina. B y D: La descarboxilación del ácido UDP-glucurónico da UDP-xilosa, potente inhibidor de la oxidación de la UDP-glucosa al ácido. E: La reducción del ácido D-glucurónico a ácido L-gulónico conduce al ascorbato, así como a la xilulosa 5-fosfato para la ruta de las pentosas fosfato.
4. **D** La glucosamina 6-fosfato se acetila; se forma la UDP-*N*-acetilglucosamina y el UDP-derivado puede epimerizarse al derivado de la galactosa. A y C: Esta conversión es una transamidación del nitrógeno amídico de la glutamina y no implica nucleótidos intermediarios. B: Aquel compuesto es un retroinhibidor de la reacción de transamidación, por lo que controla la formación de los azúcares unidos a nucleótido. E: Puede suponer un 20% del flujo de glucosa en la piel.
5. **B** La síntesis de los glúcidos complejos no utiliza moldes sino que viene determinada por la especificidad de enzimas individuales. A, C, D y E: Dada la posible diversidad de los oligosacáridos, estos compuestos desempeñan un papel importante en la determinación de la especificidad de muchas moléculas biológicas.
6. **C** La estructura central también contiene galactosa y *N*-acetilgalactosamina. A: sólo lo es el ácido siálico. La fucosa proviene de la CDP-manosa. B: Se encuentra usualmente en la periferia del glú-

cido. D: En el caso de los glúcidos con enlace *N*-glucosídico, la estructura central contiene manosa y *N*-acetilglucosamina. E: la unidad repetitiva es la hexosamina y los ácidos urónicos.

7. **B** Esta es una característica principal que los distingue de las glucoproteínas, las cuales, por definición, no contienen series repetidas. A: Estos son los glúcidos de los proteoglucanos. C: Muchos contienen sulfato pero no el hialuronato. D: Existen por lo menos seis clases diferentes. E: Los glúcidos están unidos por enlaces covalentes.
8. **E** La degradación es lisosómica; en las mucopolisacaridosis, las deficiencias en una o más hidrolasas lisosómicas conducen a la acumulación de proteoglucanos. A: La estricta especificidad de sustrato de los enzimas es fundamental en la determinación del tipo y la cantidad de los proteoglucanos que se sintetizan. También es importante la formación de proteínas aceptoras específicas. B y D: Tanto los niveles de xilosa como de ácido glucurónico están controlados por este mecanismo: la xilosa es el primer azúcar que se adiciona en la síntesis de cuatro de los seis tipos, y se acumularía si disminuyera la síntesis de la proteína central. C: Esto es necesario para la formación de muchos proteoglucanos.
9. **B** Aunque la reacción de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, específica para NADP, es reversible, la hidrólisis de la lactona asegura que el equilibrio global esté muy desplazado en la dirección del NADPH. A, C y D: Todos estos utilizan NAD y no NADP. E: Estos enzimas, aunque integrantes de la ruta de las pentosas fosfato, catalizan reacciones reversibles que no implican NADP.
10. **D** A, C, D y E: La glucosa 6-fosfato forma ribosa 5-fosfato y CO_2 en la fase oxidativa. Si esto se multiplica por seis, las seis ribosas 5-fosfato se pueden reordenar para dar cinco glucosas 6-fosfato a través de la segunda fase, la fase reversible. B: Si se necesitase más ribosa 5-fosfato que NADPH, el flujo sería en esta dirección para suministrar las pentosas necesrias.
11. **C** Esto es similar a la interconversión glucosa 6-P-fructosa 6-P. A: Las mutasas catalizan un desplazamiento 1-6 del fosfato. B, D, E: Estas conversiones no tienen lugar directamente.
12. **A** La existencia de una cadena glucídica formada sobre un soporte de dolicol fosfato es característica de las glucoproteínas unidas por *N*-. B, C, D: La síntesis de las glucoproteínas unidas por *O*- implica la adición secuencial a la *N*-acetilgalactosamina unida a serina o treonina. E: El dolicol fosfato es un lípido pero se elimina cuando se adiciona la cadena glucídica a la proteína.
13. **D** Estas anomalías estructurales están asociadas con defectos en la sulfatación de los proteoglucanos. A: Esto conduciría a una incapacidad de dirigir la hidrolasa ácida al lisosoma con lo que se incrementaría la concentración extracelular. B, E: Estos son enzimas lisosómicos cuyo defecto produciría oligosacáridos parcialmente degradados en la orina. C: La carencia de un transportador conduciría a niveles séricos de sulfato elevados.
14. **A** B: El hialuronato es un glucosaminoglucano que no está sulfatado. C: La glucoproteínas no contienen sulfato. D: La bilirrubina está conjugada con ácido glucurónico.
15. Tres pentosas fosfato (ribosa 5-P + 2 xilulosa 5-P) se convierten en 2 fructosa 6-P y un gliceraldehído 3-P por la transaldolasa y la transcetolasa a través de una serie de transferencias de dos y tres carbonos. Estas reacciones son reversibles.
16. La carencia de fructoquinasa produce acumulación de fructosa que se excreta. La carencia de aldolasa produce un incremento de fructosa 1-fosfato la cual secuestra fosfato inorgánico celular con lo que se inhibe la capacidad de la célula para generar ATP.



16

METABOLISMO LIPÍDICO I: UTILIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE ENERGÍA EN FORMA DE LÍPIDOS

J. Denis McGarry

16.1 VISIÓN GENERAL 694

16.2 NATURALEZA QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE LOS ACILGLICEROLES 695

Los ácidos grasos son cadenas alquílicas que terminan en un grupo carboxilo 695
Nomenclatura de los ácidos grasos 696
En el ser humano la mayoría de los ácidos grasos se encuentran en forma de triacilgliceroles 696
La naturaleza hidrofóbica de los lípidos es importante para sus funciones biológicas 697

16.3 FUENTES DE ÁCIDOS GRASOS 697

La mayoría de los ácidos grasos son suministrados por la dieta 697
El palmitato se sintetiza a partir del acetil CoA 698
- La formación del malonil CoA es el paso comprometido en la síntesis de ácidos grasos 698
- Secuencia de reacciones en la síntesis del ácido palmítico 700
- La ácido graso sintasa de mamíferos es un polipéptido multifuncional 701
- Estequiometría de la biosíntesis de ácidos grasos 701
- Para la síntesis de palmitato se ha de transportar el acetil CoA desde la mitocondria hasta el citosol 701

El palmitato es el precursor de otros ácidos grasos 703
- Reacciones de alargamiento 703
- Formación de ácidos monoenoicos mediante la estearil-CoA desaturasa 704
- Formación y modificación de ácidos grasos poliinsaturados 704
- Formación de hidroxiácidos grasos en el tejido nervioso 705

La ácido graso sintasa puede dar lugar a ácidos grasos diferentes del palmitato 705
Los acil CoA grasos pueden reducirse hasta alcoholes grasos 706

16.4 ALMACENAMIENTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN FORMA DE TRIACILGLICEROLES 706

En la mayoría de los tejidos los triacilgliceroles se sintetizan a partir de acil CoA grasos y glicerol 3-fosfato 707
La movilización de triacilgliceroles requiere hidrólisis 709

16.5 MÉTODOS DE TRANSPORTE DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE SUS PRODUCTOS PRIMARIOS ENTRE ÓRGANOS 710

La energía basada en lípidos se transporta por la sangre de diversas formas 710
- Las lipoproteínas plasmáticas transportan triacilgliceroles y otros lípidos 710
- Los ácidos grasos se unen a la albúmina sérica 711
- Los cuerpos cetónicos constituyen una fuente de energía basada en los lípidos 712

Las lipasas hidrolizan los triacilgliceroles de la sangre para que sus ácidos grasos puedan transferirse a los tejidos 712

16.6 UTILIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA 713

La β-oxidación de los ácidos grasos lineales es el principal proceso productor de energía 713
- Los ácidos grasos se activan mediante conversión en acil CoA graso 713
- La carnitina transporta grupos acilo a través de la membrana mitocondrial interna 713
- La β-oxidación es una secuencia de cuatro reacciones 714
- Rendimiento energético de la β-oxidación de los ácidos grasos 716
- Comparación del esquema de la β-oxidación con la biosíntesis del palmitato 716

Algunos ácidos grasos requieren modificaciones de la β-oxidación para su metabolismo 716
El propionil CoA es un producto de la oxidación de los ácidos grasos de cadena impar 717
La oxidación de ácidos grasos insaturados requiere otros enzimas 717
Algunos ácidos grasos experimentan α-oxidación 717
La ω-oxidación da lugar a un ácido dicarboxílico 719
Los cuerpos cetónicos se forman a partir de acetil CoA 720
El HMG CoA es un intermediario en la síntesis de acetoacetato a partir de acetil CoA 720
El acetoacetato produce D-β-hidroxibutirato y acetona 720
La utilización de los cuerpos cetónicos por tejidos no hepáticos precisa la formación de acetoacetil CoA 722
Durante la inanición y en ciertas condiciones patológicas se produce cetosis 722
La oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas tiene varias funciones 722

BIBLIOGRAFÍA 723

PREGUNTAS 723

RESPUESTAS 725

APLICACIONES CLÍNICAS

16.1 Obesidad 709
16.2 Leptina y obesidad 710
16.3 Anormalidades genéticas en el transporte de energía en forma de lípidos 711
16.4 Deficiencias genéticas en el transporte por carnitina o en la carnitina palmitil transferasa 715
16.5 Deficiencias genéticas en las acil-CoA deshidrogenasas 716
16.6 Enfermedad de Refsum 719
16.7 Cetoacidosis diabética 721

16.1 VISIÓN GENERAL

Mientras el cuerpo construye y renueva sus estructuras, mientras obtiene y almacena energía y realiza sus diversas funciones, se van sucediendo toda una serie de circunstancias en las que es esencial utilizar moléculas o partes de moléculas que no se asocian con el agua. Esta condición de **apolaridad** e **hidrofobicidad** es la característica que define las sustancias clasificadas como **lípidos**. Gran parte de estas moléculas contienen **ácidos grasos** o provienen de ellos. En las primeras etapas de la investigación bioquímica, no se estudiaron estas sustancias tan intensamente como otros constituyentes del cuerpo, debido en gran parte a que por entonces era más fácil desarrollar técnicas para el estudio de sistemas acuosos. Este olvido no malintencionado condujo a supuestos según los cuales los lípidos eran relativamente inertes y su metabolismo era de menor importancia que, por ejemplo, el de los glúcidos.

A medida que se desarrollaba la metodología para la investigación del metabolismo lipídico, pronto resultó evidente que los ácidos grasos y sus derivados desempeñaban, por lo menos, dos papeles importantes en el cuerpo. Se demostró que la oxidación de los ácidos grasos constituía un medio importante para la producción de energía metabólica, y se constató claramente que su almacenamiento en forma de **triacilgliceroles** era más eficiente y cuantitativamente más importante que el almacenamiento de los glúcidos en forma de glucógeno. A medida que se elucidaban los detalles de la química de las estructuras biológicas, se descubrió que las estructuras hidrofóbicas estaban compuestas mayoritariamente por ácidos grasos y sus derivados. Así, la principal separación de las células y de las estructuras subcelulares en compartimientos acuosos separados se consigue mediante el uso de membranas cuyas características hidrofóbicas se deben en gran parte a las porciones de ácido graso de los lípidos complejos. Estos últimos compuestos contienen constituyentes diferentes de los ácidos grasos y del glicerol. Frecuentemente, tienen porciones hidrofílicas unidas covalentemente, especialmente glúcidos en los glucolípidos y ésteres fosfóricos orgánicos en los fosfolípidos.

Los lípidos desempeñan además otros papeles cuantitativamente menos importantes pero que, sin embargo, son de gran significado funcional. Entre ellos se encuentran la utilización de las propiedades tensioactivas de algunos lípidos complejos para funciones específicas tales como el mantenimiento de la integridad alveolar y la solubilización de sustancias apolares en los fluidos biológicos. Además de ello, varias clases de lípidos, como por ejemplo las hormonas esteroides y las prostaglandinas, juegan papeles fisiológicos altamente eficaces y específicos en el control de procesos metabólicos. En la Figura 16.1 se bosquejan las interrelaciones de algunos procesos implicados en el metabolismo lipídico.

El metabolismo de los ácidos grasos y de los triacilgliceroles es tan importante para el correcto funcionamiento del cuerpo humano, que los desequilibrios y deficiencias en estos procesos pueden producir consecuencias patológicas importantes. Entre las enfermedades del metabolismo de los ácidos grasos y de los triacilgliceroles se encuentran la obesidad, la diabetes, la cetoacidosis y los errores del transporte de lípidos en la sangre. Además, se han hallado algunas deficiencias genéticas sin-

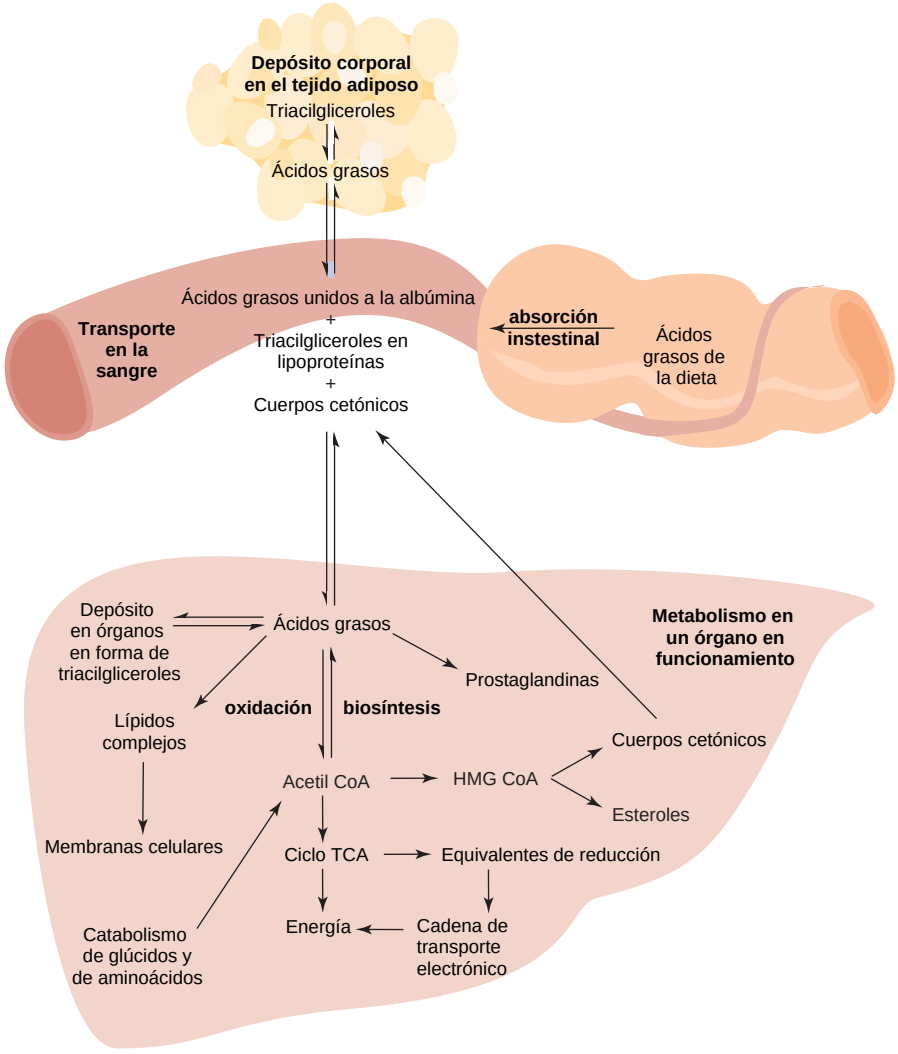


FIGURA 16.1
Interrelaciones metabólicas de los ácidos grasos en el cuerpo humano.

gulares, tales como la enfermedad de Refsum y la hipercolesterolemia familiar, que han contribuido a la elucidación de algunas rutas del metabolismo lipídico.

En este capítulo nos ocuparemos primordialmente de la estructura y metabolismo de los ácidos grasos y de su forma principal de almacenamiento, los triacilgliceroles. Después de abordar las estructuras de los ácidos grasos más importantes del cuerpo humano, describiremos cómo son suministrados a partir de la dieta o por biosíntesis. Describiremos el mecanismo de almacenamiento en forma de triacilgliceroles, y el modo en que se movilizan y transportan los ácidos grasos a través del cuerpo hacia los lugares en donde son requeridos. A continuación se expondrá el proceso central de producción de energía a partir de los ácidos grasos y, finalmente, los mecanismos de síntesis y utilización de los cuerpos cetónicos. En el apéndice (p. 1175) se aborda la nomenclatura y química de los lípidos, y en el Capítulo 25 (p. 1104) se presenta su digestión y absorción.

16.2 NATURALEZA QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE LOS ACILGLICEROLES

Los ácidos grasos son cadenas alquílicas que terminan en un grupo carboxilo

Los **ácidos grasos** constan de una **cadena alquílica** con un grupo carboxilo terminal; la fórmula básica de una especie completamente saturada es $CH_3—(CH_2)_n—COOH$. Los ácidos grasos de importancia para el ser humano tienen estructuras relativamente sencillas, aunque los ácidos grasos de algunos organismos son a veces muy complejos y contienen anillos de ciclopropano o abun-

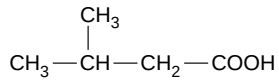
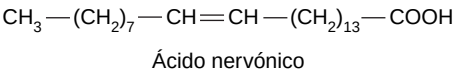


FIGURA 16.2
Ácido isovalérico.

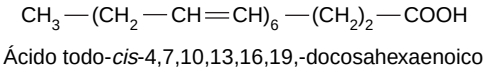
dantes ramificaciones. En los ácidos grasos humanos aparecen comúnmente insaturaciones con hasta seis dobles enlaces por cadena, y sus dobles enlaces son casi siempre de configuración cis. Si hay más de un doble enlace por molécula, entonces estos enlaces están siempre separados por un **grupo metileno** (—CH_2—). Los ácidos grasos más comunes de los sistemas biológicos tienen un número par de átomos de carbono, aunque algunos organismos sintetizan ácidos grasos con un número impar de carbonos. El ser humano puede utilizar estos últimos para producir energía o incorporarlos, pero en grado mínimo, a los lípidos complejos.

El organismo humano produce y utiliza estructuralmente algunos ácidos grasos con un grupo α-hidroxilo. No obstante, las formas más oxidadas sólo se producen nomalmente como intermediarios metabólicos durante la producción de energía, o para una actividad fisiológica específica en el caso de las prostaglandinas y tromboxanos. Algunos animales, incluido el ser humano, también producen **ácidos grasos ramificados** relativamente sencillos en los que la ramificación se limita a grupos metilo en una o más posiciones a lo largo de la cadena. Estos ácidos se producen aparentemente para conferir propiedades físicas específicas a algunas secreciones y estructuras. Por ejemplo, en los lípidos de las estructuras localizadoras de eco de los mamíferos marinos, se encuentran grandes cantidades de ácidos grasos de cadena ramificada, entre ellos especialmente el ácido isovalérico (Figura 16.2). La dilucidación del papel de estos lípidos en la focalización del sonido ha de ser fascinante.

La mayor parte de los ácidos grasos del cuerpo humano tienen 16, 18 ó 20 átomos de carbono, si bien hay varios con cadenas más largas y que se encuentran principalmente en los lípidos del sistema nervioso. Entre ellos se encuentra el ácido nervónico y un ácido de 22 carbonos con seis dobles enlaces (Figura 16.3).



Ácido nervónico



Ácido todo-*cis*-4,7,10,13,16,19,-docosahexaenoico

FIGURA 16.3
Ácidos grasos de cadena larga.

Nomenclatura de los ácidos grasos

Los ácidos grasos más abundantes tienen nombres comunes que han sido aceptados para su uso en la nomenclatura oficial. En la Tabla 16.1 se presentan algunos ejemplos de estos ácidos, junto con sus nombres sistemáticos oficiales. Las abreviaturas oficiales consisten en el número de átomos de carbono seguido por dos puntos y el número de dobles enlaces. Los átomos de carbono se numeran con el carbono carboxílico como número 1, y la localización de los dobles enlaces se designa por el número del átomo de carbono donde éste empieza, contando a partir del extremo carboxilo del ácido. Estas designaciones de los dobles enlaces están entre paréntesis detrás del resto del símbolo.

En el ser humano la mayoría de los ácidos grasos se encuentran en forma de triacilgliceroles

Cuando se almacenan para su utilización futura, los ácidos grasos se encuentran principalmente en forma de ésteres del glicerol, tal como se muestra en la Figura 16.4. Los compuestos con un ácido graso esterificado (**monoacilgliceroles**) o dos (**diacilgliceroles**) se encuentran solamente en cantidades relativamente pequeñas, y aparecen en gran medida como intermediarios metabólicos en la biosíntesis y degradación de lípidos que contienen glicerol. La mayor parte de los ácidos grasos del cuerpo humano existen en forma de **triacilgliceroles**, en los que los tres grupos hidroxilo del glicerol están esterificados con un ácido graso. Estos compuestos han sido denominados históricamente "grasas neutras o triglicéridos". Existen en el cuerpo otros tipos de "grasas neutras", y los términos, "monoglicérido", "diglicérido" y "triglicérido" son químicamente incorrectos, por lo que no deberían usarse.

TABLA 16.1 Ácidos grasos de importancia para el ser humano

Símbolo numérico	*Estructura*	*Nombre corriente*	*Nombre sistemático*
16:0	CH_3—$(CH_2)_{14}$—COOH	Palmítico	Hexadecanoico
16:1(9)	CH_3—$(CH_2)_5$—CH=CH—$(CH_2)_7$—COOH	Palmitoleico	*cis*-9-Hexadecenoico
18:0	CH_3—$(CH_2)_{16}$—COOH	Esteárico	Octadecanoico
18:1(9)	CH_3—$(CH_2)_7$—CH=CH—$(CH_2)_7$—COOH	Oleico	*cis*-9-Octadecenoico
18:2(9,12)	CH_3—$(CH_2)_3$—$(CH_2$—CH=CH)$_2$—$(CH_2)_7$—COOH	Linoleico	*cis,cis*-9,12-Octadecadienoico
18:3(9,12,15)	CH_3—$(CH_2$—CH=CH)$_3$—$(CH_2)_7$—COOH	Linolénico	*cis,cis,cis*-9,12,15-Octadecatrienoico
20:4(5,8,11,14)	CH_3—$(CH_2)_3$—$(CH_2$—CH=CH)$_4$—$(CH_2)_3$—COOH	Araquidónico	*cis,cis,cis,cis*-5,8,11,14-Icosatetraenoico

La distribución de los diversos ácidos grasos en las tres posiciones del glicerol de los triacilgliceroles del cuerpo en un momento dado dependen de muchos factores, entre los que se encuentran la dieta y localización anatómica del triacilglicerol. Son raros los compuestos que contienen el mismo ácido graso en las tres posiciones, y lo normal es que se dé una compleja mezcla de ellos.

La naturaleza hidrofóbica de los lípidos es importante para sus funciones biológicas

Una propiedad significativa de los ácidos grasos y de los triacilgliceroles es su falta de afinidad por el agua. Las largas cadenas hidrocarbonadas tienen escasísimas posibilidades de formación de puentes de hidrógeno. Los ácidos grasos, tanto si están sin esterificar como si forman parte de lípidos complejos, tienen una tendencia mucho mayor a asociarse entre sí o con otras estructuras hidrofóbicas, tales como los esteroles y las cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos, que a hacerlo con el agua o con compuestos orgánicos polares. Este carácter hidrofóbico es esencial para la construcción de estructuras biológicas complejas tales como las membranas.

La **naturaleza hidrofóbica** de los triacilgliceroles y su estado altamente reducido los hacen compuestos eficientes en comparación con el glucógeno para el almacenamiento de energía. Hay tres puntos que merecen ser recalcados. En primer lugar, a igualdad de peso, la cantidad de ATP que se obtiene de la oxidación completa de los triacilgliceroles es dos veces y media superior a la correspondiente al glucógeno puro. En segundo lugar, los triacilgliceroles se pueden almacenar sin asociarse con agua, mientras que el glucógeno es muy hidrofílico, de modo que cuando se almacena en los tejidos, fija el doble de su peso de agua. De este modo, la cantidad equivalente de energía metabólicamente recuperable almacenada como glucógeno hidratado pesaría alrededor de cuatro veces más que si se almacenase en forma de triacilgliceroles. Por último, una persona de 70 kg de peso almacena alrededor de 350 g de glúcidos como glucógeno hepático y muscular. Esto representa alrededor de 1400 kcal de energía utilizable, cantidad escasamente suficiente para mantener las funciones corporales durante 24 horas de ayuno. En cambio, la reserva normal de grasa suministra energía suficiente para sobrevivir durante varias semanas de ayuno absoluto.

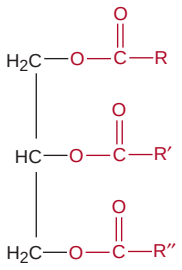
La mayor parte de los ácidos grasos del cuerpo humano son saturados o contienen sólo un doble enlace. Aunque son rápidamente catabolizados por enzimas y cofactores adecuados, estos ácidos son químicamente bastante inertes. Los ácidos grasos altamente insaturados de los tejidos son más susceptibles a la oxidación.

16.3 FUENTES DE ÁCIDOS GRASOS

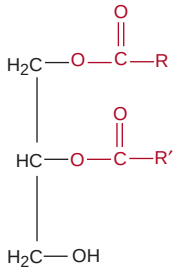
Tanto la dieta como la biosíntesis suministran los ácidos grasos requeridos por el cuerpo humano para la obtención de energía y la construcción de las partes hidrofóbicas de las biomoléculas. Las cantidades de proteína y glúcido ingeridas en exceso por la dieta se convierten fácilmente en ácidos grasos y se almacenan en forma de triacilgliceroles.

La mayoría de los ácidos grasos son suministrados por la dieta

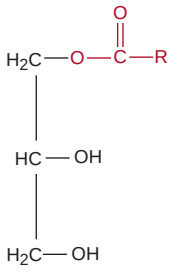
Diversos lípidos animales y vegetales son ingeridos, hidrolizados, al menos parcialmente, por enzimas digestivos, y luego absorbidos a través de la mucosa intestinal para entonces ser distribuidos a través del cuerpo, primero en el sistema linfático y después en el torrente circulatorio. Estos procesos se tratan en el Capítulo 25 (véase p. 1104). El suministro alimenticio determina en gran medida la composición de ácidos grasos de los lípidos corporales. Procesos metabólicos que tienen lugar en varios tejidos modifican tanto los ácidos grasos de la dieta como los que son sintetizados *de novo* para producir casi todas las estructuras requeridas. Con sólo una excepción, la composición concreta de los ácidos grasos suministrados por la dieta carece relativamente de importancia. Esta excepción consiste en la necesidad de proporciones adecuadas de ácidos grasos con grados de insaturación relativamente elevados, ya que muchos mamíferos superiores, incluido el ser humano, son incapaces de producir ácidos grasos con dobles enlaces cerca del extremo metilo de la molécula. Ciertos **ácidos poliinsaturados** (PUFA) con dobles enlaces dentro de los siete últimos enlaces por el extremo metilo (ácido linoleico) son esenciales para algunas funciones específicas. Aunque no se conocen todas las razones de este requisito, una de ellas es que estos ácidos son precursores de las prostaglandinas, productos de oxidación muy activos (véase p. 766).



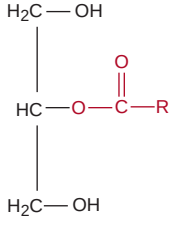
Triacilglicerol



Diacilglicerol



1–Monoacilglicerol



2–Monoacilglicerol

FIGURA 16.4
Acilgliceroles.

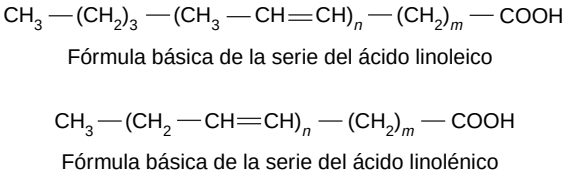


FIGURA 16.5
Series de los ácidos linoleico y linolénico.

En el ser humano, es esencial un precursor en la dieta para dos series de ácidos grasos. Éstas son las series del linoleico y del linolénico (Figura 16.5), conocidas, a veces, como PUFA *n*-6 (u ω-6) y *n*-3 (u ω-3), respectivamente, para indicar la presencia de un doble enlace después del sexto y tercer átomo de carbono a contar desde el átomo de carbono del metilo terminal (ω)

El palmitato se sintetiza a partir del acetil CoA

La segunda fuente principal de ácidos grasos en los humanos es su biosíntesis a partir de intermediarios de pequeño tamaño, que pueden provenir de la degradación metabólica de azúcares, de algunos aminoácidos y de otros ácidos grasos. Se sintetiza en primer lugar el **ácido palmítico**, ácido saturado de cadena lineal de 16 carbonos, y los demás ácidos grasos se obtienen mediante modificaciones del ácido palmítico. El acetil CoA proporciona todos los átomos de carbono para esta síntesis. Los ácidos grasos se obtienen mediante adición secuencial de unidades bicarbonadas al extremo carboxilo activado de una cadena en crecimiento. En los sistemas de mamíferos, la secuencia de reacciones se lleva a cabo por la **ácido graso sintasa**.

La ácido graso sintasa es un fascinante complejo enzimático que aún hoy continúa siendo estudiado intensamente. En bacterias, es un complejo de varias proteínas, mientras que en las células de mamíferos es una proteína multifuncional única. La unidad cebadora de la síntesis de ácidos grasos es el acetil CoA o el butiril CoA, y el extremo metilo de estos cebadores es el extremo metilo del palmitato. La adición del resto de unidades bicarbonadas requiere la activación del carbono metílico del acetil CoA mediante carboxilación para producir malonil CoA. Sin embargo, el CO_2 añadido en este proceso se pierde en la condensación del malonil CoA a la cadena en crecimiento, de tal manera que los carbonos de la cadena de palmitato se originan solamente a partir de acetil CoA.

La formación del malonil CoA es el paso comprometido en la síntesis de ácidos grasos

La reacción que compromete al acetil CoA para la síntesis de ácidos grasos es su carboxilación a **malonil CoA** por el enzima **acetil-CoA carboxilasa** (Figura 16.6). Esta reacción es similar, en muchos aspectos, a la carboxilación del piruvato, catalizada por la piruvato carboxilasa, que inicia el proceso de la gluconeogénesis. La reacción requiere ATP y HCO_3^- como fuente de CO_2. Al igual que en el caso de la piruvato carboxilasa, el primer paso es la formación de CO_2 activado sobre la porción de biotina de la acetil-CoA carboxilasa, utilizando la energía del ATP. A continuación, este CO_2 se transfiere al acetil CoA.

La acetil-CoA carboxilasa, un punto de control clave en la síntesis global de ácidos grasos, se puede aislar en un estado protomérico que es inactivo. Adicionando citrato *in vitro*, estos protómeros se agregan para dar polímeros enzimáticamente ac-

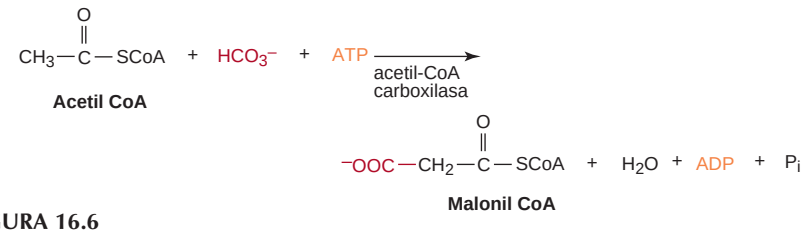


FIGURA 16.6
Reacción de la acetil-CoA carboxilasa.

tivos. El palmitil CoA inhibe el enzima activo *in vitro*. La acción de estos dos efectores es muy lógica. El aumento de la síntesis de ácidos grasos para almacenar energía es deseable cuando el citrato está a alta concentración, y es necesaria una disminución de la síntesis si se dan niveles elevados del producto. Sin embargo, no se sabe hasta qué grado operan realmente estos mecanismos reguladores *in vivo*.

La acetil-CoA carboxilasa es también controlada por un mecanismo de fosforilación–desfosforilación mediante cAMP, en el que el enzima fosforilado es menos activo que el desfosforilado. Hay pruebas que sugieren que la fosforilación está promovida por el glucagón (vía cAMP), así como por el AMP (vía una quinasa activada por AMP), y que la presencia de la forma activa es promovida por la insulina. Estos efectos de fosforilación a través de hormonas son probablemente diferentes de los efectos alostéricos del citrato y del palmitil CoA (véase Tabla 16.2).

TABLA 16.2 Regulación de la síntesis de ácidos grasos

Enzima	*Agente regulador*		*Efecto*
	Biosíntesis de palmitato		
Acetil-CoA carboxilasa	Corto plazo	Citrato	Activación alostérica
		Acil CoAs C16–C18	Inhibición alostérica
		Insulina	Estimulación
		Glucagón	Inhibición
		Fosforilación a través de cAMP y AMP	Inhibición
		Desfosforilación	Estimulación
	Largo plazo	Dieta con alto contenido glucídico	Estimulación por incremento de la síntesis del enzima
		Dieta libre de grasas	Estimulación por incremento de la síntesis del enzima
		Dieta con alto contenido de grasas/PUFA	Inhibición por disminución de la síntesis del enzima
		Ayuno	Inhibición por disminución de la síntesis del enzima
		Glucagón	Inhibición por disminución de la síntesis del enzima
Ácido graso sintasa	Azúcares fosforilados		Activación alostérica
	Dieta con alto contenido glucídico		Estimulación por incremento de la síntesis del enzima
	Dieta sin grasas		Estimulación por incremento de la síntesis del enzima
	Dieta con alto contenido de grasas/PUFA		Inhibición por disminución de la síntesis del enzima
	Ayuno		Inhibición por disminución de la síntesis del enzima
	Glucagón		Inhibición por disminución de la síntesis del enzima
	Biosíntesis de ácidos grasos diferentes del palmitato		
Ácido graso sintasa	Alta relación metilmalonil CoA//malonil CoA		Síntesis incrementada de ácidos grasos metilados
	Cofactor de la tioesterasa		Finalización de la síntesis con un producto de cadena corta
Estearil-CoA desaturasa	Diversas hormonas		Estimulación de la síntesis de ácidos grasos insaturados por síntesis del enzima incrementada
	Ácidos grasos poliinsaturados de la dieta (PUFA)		Actividad disminuida

La síntesis de la acetil-CoA carboxilasa también está regulada. Los animales con una dieta con alto contenido en glúcidos o libre de grasas producen más enzima, mientras que en ayuno o con dietas ricas en grasa disminuye su síntesis.

Secuencia de reacciones en la síntesis del ácido palmítico

La primera reacción catalizada por la ácido graso sintasa en las bacterias es la transacilación de la molécula cebadora, el acetil CoA o el butiril CoA, a una porción 4′-fosfopanteteína de un constituyente proteico del complejo multienzimático. Esta proteína es la **proteína transportadora de acilo (ACP, *acyl carrier protein*)**, y su unidad de fosfopanteteína es idéntica a la del CoA. El enzima de los mamíferos también contiene una unidad de fosfopanteteína. A continuación, se añaden de forma secuencial al complejo enzimático seis o siete unidades bicarbonadas, hasta completar la molécula de palmitato. Después de la adición de cada unidad bicarbonada, tiene lugar una serie de pasos reductores. La secuencia de reacciones que conducen a butiril-ACP, iniciada con un acetil CoA cebador, se presenta en la Figura 16.7.

El siguiente ciclo de síntesis empieza con la transferencia de la cadena de ácido graso recién formada desde la porción 4′-fosfopanteteína de la ACP hacia unl grupo —SH funcional de la ***β*-cetoacil- ACP sintasa** (análogo a la reacción 3a). Esto deja al grupo —SH de la ACP libre y dispuesto para aceptar una segunda unidad malonilo del malonil CoA (reacción 2), y permite la generación de hexanil-ACP a través

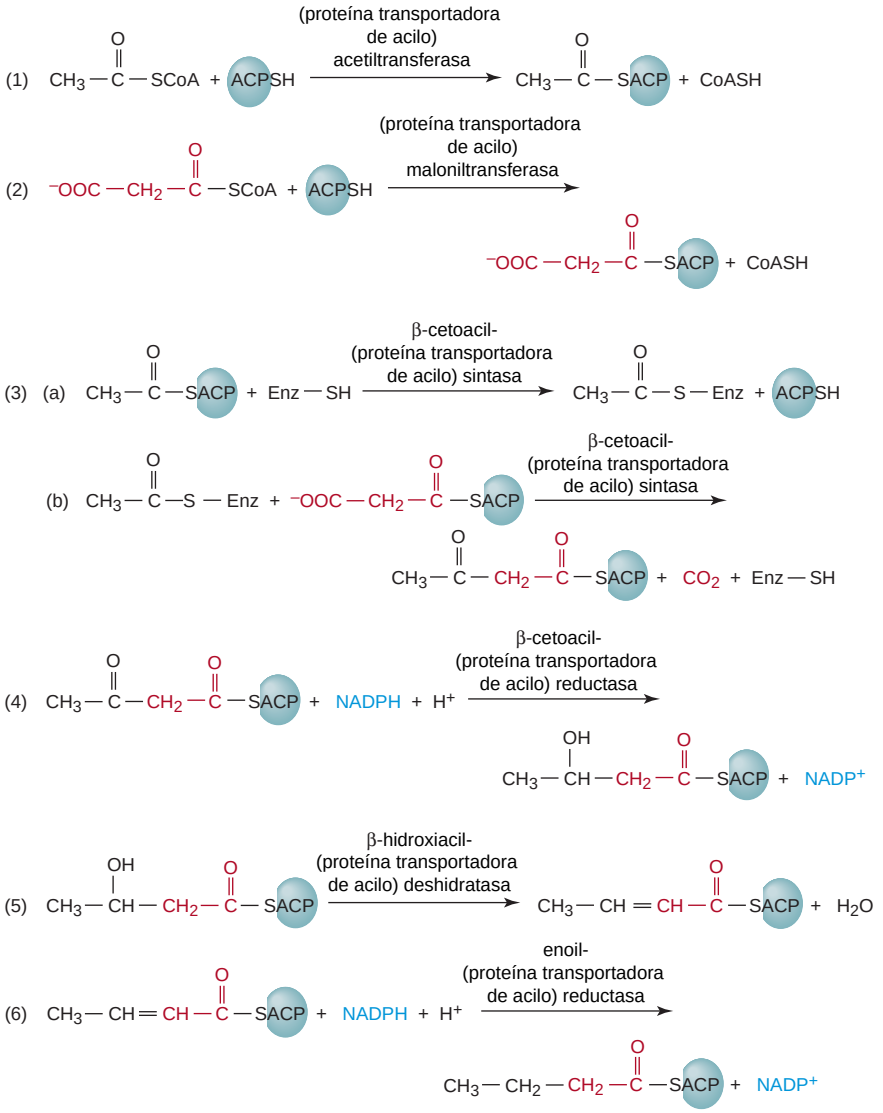


FIGURA 16.7
Reacciones catalizadas por la ácido graso sintasa.

de las reacciones 3b a 6. Este proceso se repite cinco veces más, momento en el que una **tioesterasa** actúa sobre el palmitil-CoA, con la consiguiente producción de ácido palmítico libre (Figura 16.8). Obsérvese que a este nivel los grupos sulfihidrilo de la ACP y de la β-cetoacil-ACP sintasa están ambos libres, por lo que puede iniciarse un nuevo ciclo de síntesis de ácidos grasos.

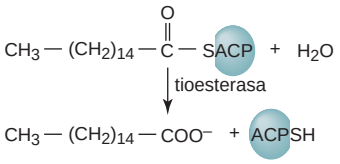


FIGURA 16.8
Liberación del ácido palmítico de la ácido graso sintasa.

La ácido graso sintasa de mamíferos es un polipéptido multifuncional

La anterior secuencia de reacciones es el modelo básico de biosíntesis de ácidos grasos en los organismos vivos. Sin embargo, falta mucho por esclarecer acerca de los detalles de los mecanismos de reacción, que además pueden variar entre las especies. Todas estas reacciones están catalizadas por el denominado complejo de la ácido graso sintasa, pero su estructura y propiedades pueden variar considerablemente. Los enzimas individuales de *Escherichia coli* son disociables. En cambio, la **ácido graso sintasa de mamíferos** está compuesta por dos subunidades probablemente idénticas, cada una de las cuales es un polipéptido multienzimático que posee todas las actividades catalíticas necesarias dispuestas en una serie lineal. Dentro de las especies y tejidos de mamíferos existen ciertas variaciones.

Parece ser que la cadena de ácido graso que crece está unida continuamente a la proteína multifuncional y que es transferida de modo secuencial entre el grupo de 4′-fosfopanteteína de la ACP, un dominio de la proteína, y el grupo sulfhidrilo de una cisteína de la β-cetoacil-ACP sintasa durante la reacción de condensación (reacción 3, Figura 16.7) (véase también la Figura 16.9). También es probable que tenga lugar una acilación intermedia sobre un residuo de serina cuando se adicionan unidades de acil CoA a la ACP ligada al enzima en las reacciones de transacilación.

La regulación principal de la biosíntesis del palmitato tiene lugar, probablemente, mediante el control de las velocidades de síntesis y degradación del enzima. En la Tabla 16.2 se da una lista de los agentes y condiciones implicados en esta regulación. Éstos son lógicos para mantener un equilibrio en la utilización eficiente de los diferentes sustratos energéticos biológicos.

Estequiometría de la biosíntesis de ácidos grasos

Cuando el acetil CoA es el cebador de la biosíntesis del palmitato, la reacción global es

$$CH_3{-}C(=O){-}SCoA + 7\ {}^{-}OOC{-}CH_2{-}C(=O){-}SCoA + 14\ NADPH + 14\ H^+ \longrightarrow CH_3{-}(CH_2)_{14}{-}COO^- + 7\ CO_2 + 14\ NADP^+ + 8\ CoASH + 6\ H_2O$$

Al calcular la energía necesaria para la conversión global de acetil CoA a palmitato, debemos añadir el ATP utilizado en la formación de malonil CoA:

$$7\ CH_3{-}C(=O){-}SCoA + 7\ CO_2 + 7\ ATP \longrightarrow 7\ {}^{-}OOC{-}CH_2{-}C(=O){-}SCoA + 7\ ADP + 7\ P_i$$

La estequiometría general de la conversión del acetil CoA a palmitato es entonces

$$8\ CH_3{-}C(=O){-}SCoA + 7\ ATP + 14\ NADPH + 14\ H^+ \longrightarrow CH_3{-}(CH_2)_{14}{-}C(=O){-}O^- + 8\ CoASH + 7\ ADP + 7\ P_i + 6\ H_2O + 14\ NADP^+$$

Para la síntesis de palmitato se ha de transportar el acetil CoA desde la mitocondria hasta el citosol

La ácido graso sintasa y la acetil-CoA carboxilasa se encuentran en el citosol, donde se realiza la biosíntesis del palmitato. Los tejidos de mamíferos deben utilizar procesos especiales a fin de asegurar un suministro adecuado de acetil CoA y de NADPH para esta síntesis en el citosol. La fuente principal de acetil CoA es la reacción de la piruvato deshidrogenasa en la matriz de la mitocondria. Dado que la membrana interna de las mitocondrias no es fácilmente permeable al acetil CoA, un proceso que involucra al citrato transfiere la unidad de C_2 al citosol para la biosíntesis de palmitato. Este mecanismo (Figura 16.10) aprovecha el hecho de que el citrato se intercambia libremente desde la mitocondria al citosol mediante un trans-

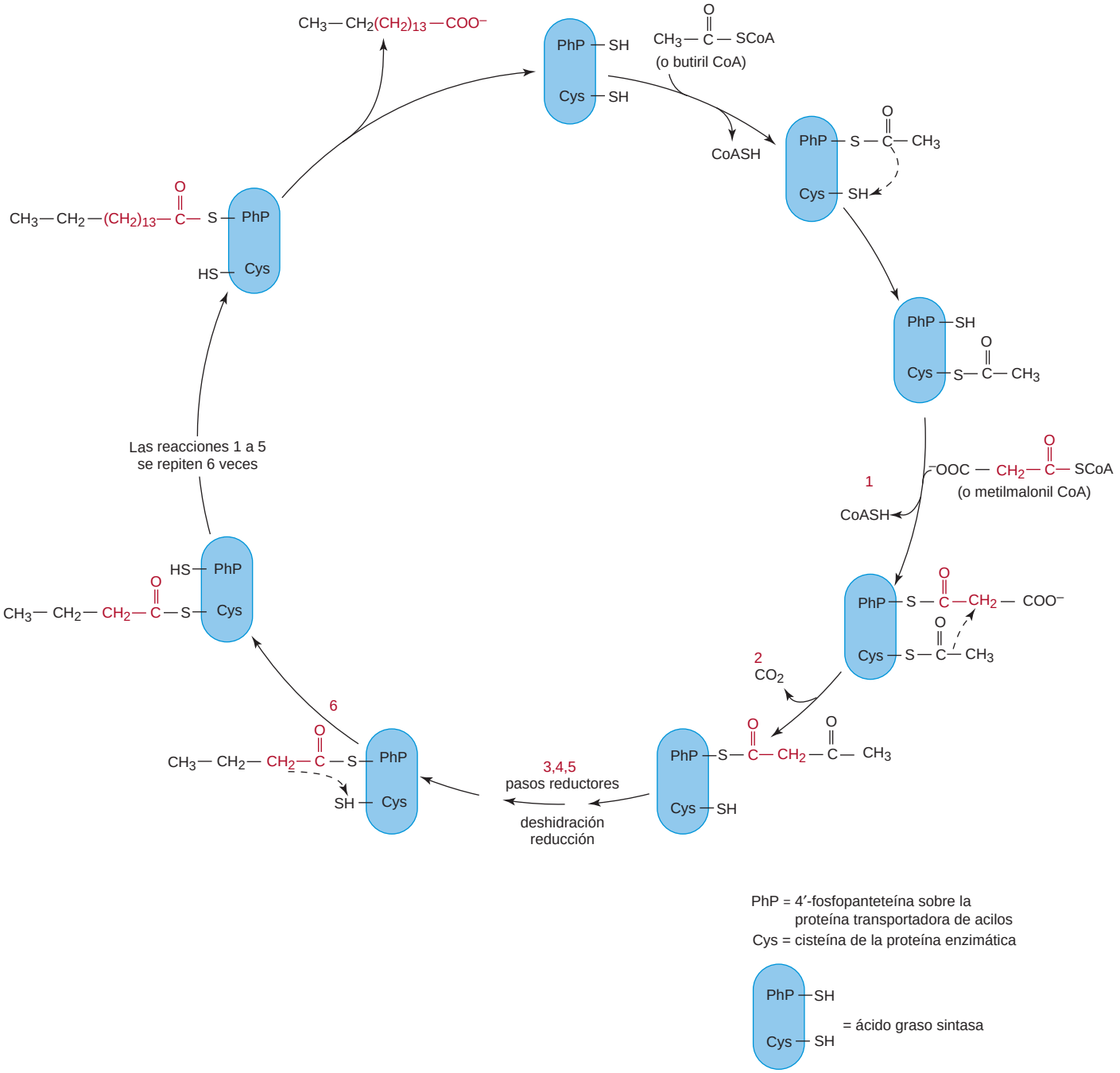


FIGURA 16.9
Mecanismo propuesto para las reacciones de alargamiento que tienen lugar sobre la ácido graso sintasa de mamíferos.

portador de tricarboxilato (véase p. 583), y que en el citosol hay un enzima que lo convierte en acetil CoA y oxalacetato. Cuando hay un exceso de citrato proveniente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, este intermediario pasa al citosol y suministra entonces acetil CoA para la biosíntesis de ácidos grasos. La reacción de escisión, que requiere energía, es catalizada por la **ATP-citrato liasa**:

$$\text{citrato} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightarrow \text{acetil CoA} + \text{ADP} + P_i + \text{oxalacetato}$$

Este mecanismo tiene otras ventajas adicionales, ya que el CO_2 y el NADPH para la síntesis del palmitato se pueden producir a partir del exceso de oxalacetato citosólico. Tal como se muestra en la Figura 16.10, el NADH reduce el oxalacetato a malato por acción de la **malato deshidrogenasa**, y el malato es entonces descar-

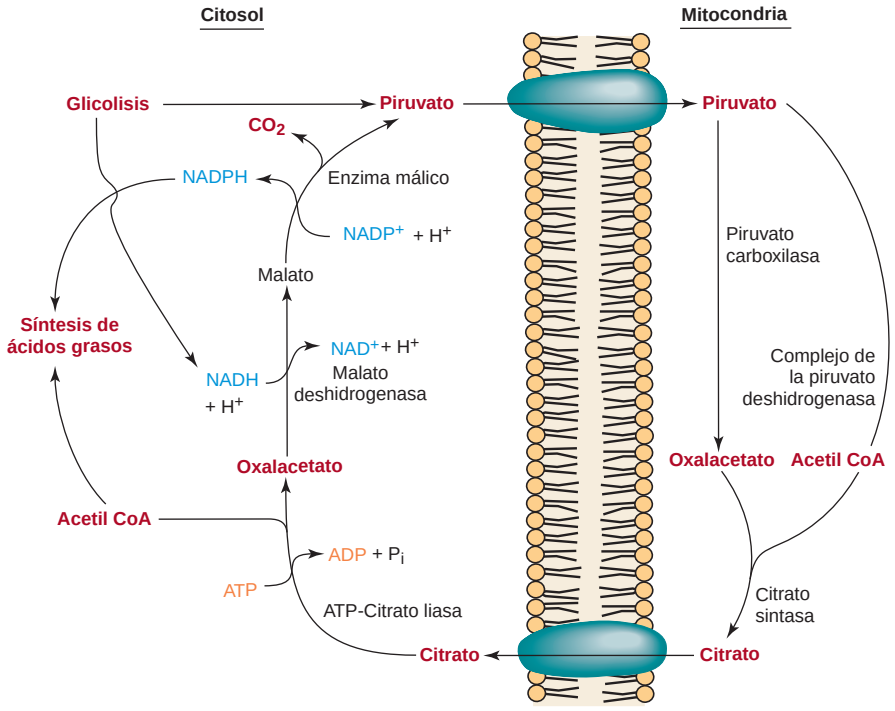


FIGURA 16.10
Mecanismo para la transferencia de acetil CoA desde la mitocondria al citosol para la biosíntesis de ácidos grasos.

boxilado por el **enzima málico ligado a NADP** (malato: $NADP^+$ oxidorreductasa descarboxilante) produciendo NADPH, piruvato y CO_2. De esta manera, el NADPH se produce a partir de NADH generado en la glucólisis. El ciclo se completa con el retorno del piruvato a la mitocondria, donde puede carboxilarse para regenerar oxalacetato, tal como se describió en el proceso de la gluconeogénesis (véase p. 633).

En resumen, se convierte 1 NADH en NADPH por cada acetil CoA transferido desde la mitocondria al citosol, y cada transferencia requiere 1 ATP. La transferencia de los 8 acetil CoA utilizados por cada molécula de palmitato suministra 8 NADPH. Dado que la biosíntesis de cada palmitato requiere 14 NADPH, los otros 6 NADPH deben ser suministrados por la ruta de las pentosas fosfato también presente en el citosol. Esta estequiometría es, por descontado, hipotética. Las relaciones *in vivo* se complican por el hecho de que el transporte del citrato y de los otros ácidos di- y tricarboxílicos a través de la membrana interna mitocondrial tiene lugar mediante varios mecanismos de intercambio de uno por uno. Las velocidades de flujo reales están controladas probablemente por una resultante de los gradientes de concentración de varios de estos sistemas de intercambio.

El palmitato es el precursor de otros ácidos grasos

El cuerpo humano puede sintetizar todos los ácidos grasos que necesita a partir del palmitato, con excepción de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales (véase p. 697). Estas síntesis requieren una variedad de sistemas enzimáticos en diversas localizaciones celulares. El palmitato producido por la ácido graso sintasa es modificado mediante tres procesos: alargamiento, desaturación e hidroxilación.

Reacciones de alargamiento

En mamíferos, el **alargamiento de los ácidos grasos** tiene lugar bien en el retículo endoplasmático, bien en la mitocondria; los procesos son ligeramente diferentes en cada sitio. En el retículo endoplasmático, la secuencia de reacciones es parecida a la que tiene lugar en la ácido graso sintasa citosólica, siendo el malonil CoA la fuente de unidades bicarbonadas y el NADPH la del poder reductor. El sustrato preferido para el alargamiento es el palmitil CoA. A diferencia de la síntesis del palmitato, los intermediarios en las reacciones posteriores son ésteres del CoA en lugar de estar unidos a una proteína, lo que apunta a que el proceso es ejecutado por enzimas diferentes y no por un complejo del tipo de la ácido graso sintasa. En muchos tejidos, este sistema de alargamiento situado en el retículo endoplasmático

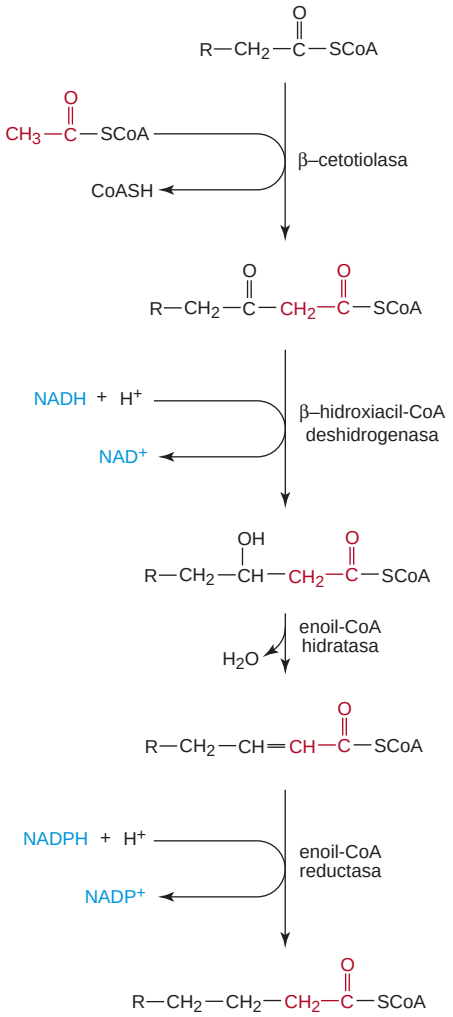


FIGURA 16.11
Alargamiento mitocondrial de los ácidos grasos.

convierte casi exclusivamente el palmitato en estearato. No obstante, el cerebro contiene uno o más sistemas de alargamiento adicionales que sintetizan los ácidos de cadena más larga (hasta C_{24}) necesarios para los lípidos del cerebro. Estos últimos sistemas también utilizan malonil CoA como sustrato.

El sistema de alargamiento situado en la mitocondria utiliza como fuente de unidades bicarbonadas adicionadas el acetil CoA y tanto el NADH como el NADPH actúan como agentes reductores (Figura 16.11). Este sistema funciona invirtiendo la ruta de la β-oxidación de los ácidos grasos (véase Sección 16.6, p. 713), con la excepción de que la enoil-CoA reductasa ligada a NADPH (último paso del alargamiento) sustituye a la acil-CoA deshidrogenasa ligada a FAD (primer paso de la β-oxidación). Este proceso es muy poco activo con sustratos de acil CoA de 16 átomos de carbono o más, lo que parece indicar que actuaría fundamentalmente en el alargamiento de cadenas más cortas.

Formación de ácidos monoenoicos mediante la estearil-CoA desaturasa

En los animales superiores, la **desaturación de los ácidos grasos** tiene lugar en el retículo endoplasmático, y el sistema oxidante utilizado para introducir dobles enlaces cis es significativamente diferente del utilizado en los procesos de oxidación principales de los ácidos grasos en la mitocondria. Los sistemas del retículo endoplasmático han sido denominados, a veces, "**oxidasas de función mixta**", ya que los enzimas oxidan dos sustratos simultáneamente. En la desaturación de los ácidos grasos, uno de estos sustratos es el NADPH, y el otro es el ácido graso. Los electrones del NADPH se transfieren a través de una flavoproteína reductasa específica y un citocromo a un "**oxígeno activo**", que oxidará entonces al ácido graso. Aunque no se conoce el mecanismo completo, este último paso puede implicar una hidroxilación. Los tres componentes del sistema son el **enzima desaturasa**, el **citocromo b_5** y la **NADPH citocromo b_5 reductasa**. La reacción global es

$$R{-}CH_2{-}CH_2{-}(CH_2)_7{-}COOH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow$$
$$R{-}CH{=}CH{-}(CH_2)_7{-}COOH + NADP^+ + 2\ H_2O$$

La especificidad enzimática implica que el grupo R contenga como mínimo seis átomos de carbono.

Los mecanismos de regulación que gobiernan la conversión del palmitato a ácidos grasos insaturados son complejos. Una consideración importante es el control de las cantidades de los diferentes ácidos grasos insaturados sintetizados para un mantenimiento adecuado del estado físico de los triacilgliceroles almacenados y de los fosfolípidos de las membranas. Un paso de compromiso en la formación de ácidos grasos insaturados a partir del palmitato o del estearato es la introducción del primer doble enlace entre los átomos C-9 y C-10 por la **estearil CoA-desaturasa** con producción de ácido palmitoleico u oleico, respectivamente. La actividad de este enzima y su síntesis están controladas tanto por la dieta como por mecanismos hormonales. El incremento en la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de la dieta de animales de experimentación disminuye la actividad de la estearil-CoA desaturasa en el hígado, mientras que la insulina, triyodotironina e hidrocortisona dan lugar a su inducción.

Formación y modificación de ácidos grasos poliinsaturados

El cuerpo humano puede sintetizar diversos **ácidos grasos poliinsaturados** mediante la combinación de reacciones de alargamiento y desaturación. Una vez que ha sido introducido el doble enlace inicial entre los carbonos 9 y 10 por la estearil-CoA desaturasa, pueden introducirse dobles enlaces adicionales después de los carbonos 4, 5 ó 6. Es probable que en algunos tejidos se produzca también desaturación en el C-8. En la Figura 16.12 se muestran las posiciones de estas desaturaciones. Las especificidades relativas de los diversos enzimas aún tienen que ser completamente elucidadas, pero parece ser que el alargamiento y desaturación pueden tener lugar en

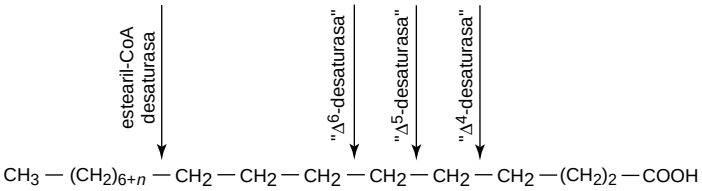
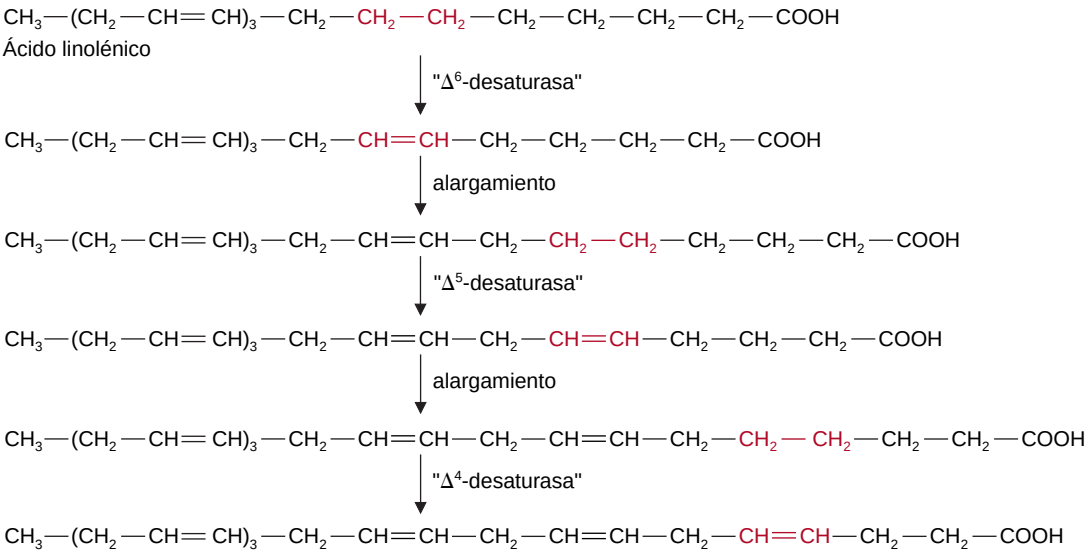


FIGURA 16.12
Posiciones de la cadena de ácidos grasos en las que puede tener lugar la desaturación en el cuerpo humano.
Como mínimo, seis enlaces sencillos deben hallarse siempre en la cadena hacia el extremo metilo de la molécula por detrás del enlace que sufre desaturación.

orden indistino. La conversión del ácido linolénico al ácido todo *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico en el cerebro es un ejemplo específico de tal secuencia:



Ácido todo-*cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico

Los ácidos grasos poliinsaturados, en especial el ácido araquidónico, son los precursores de los altamente activos prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. En función del ácido graso precursor y de la secuencia de oxidaciones que convierten los ácidos en los compuestos activos, se pueden formar diferentes clases de prostaglandinas. En el Capítulo 17 se presenta una exposición detallada sobre estas sustancias y sobre su formación (véase p. 766). Los ácidos grasos poliinsatuados de los sistemas vivos tienen un potencial de autooxidación significativo, un proceso que puede tener importantes consecuencias fisiológicas y/o patológicas. Las recciones de autooxidación son las que que originan el enranciamiento de las grasas y el secado del aceite de linaza de las pinturas.

Formación de hidroxiácidos grasos en el tejido nervioso

Aparentemente, existen dos procesos diferentes que producen **α-hidroxiácidos grasos** en los animales superiores. Uno tiene lugar en las mitocondrias de muchos tejidos, y actúa sobre ácidos grasos de cadena relativamente corta (véase Sección 16.6, p. 713). El segundo proceso sólo ha podido ser demostrado en tejidos del sistema nervioso, en donde produce ácidos grasos de cadena larga con un grupo hidroxilo sobre el C-2. Estos ácidos grasos son necesarios para la estructura de algunos lípidos de la mielina. Se ha estudiado el caso específico de la α-hidroxilación del ácido lignocérico a ácido cerebrónico. Estos enzimas utilizan preferentemente ácidos grasos C_{22} y C_{24}, y tienen características de los sistemas de "oxidasa de función mixta" que requieren oxígeno molecular y NADH o NADPH. Esta síntesis puede estar estrechamente coordinada con la biosíntesis de esfingolípidos que contienen ácidos grasos hidroxilados.

La ácido graso sintasa puede dar lugar a ácidos grasos diferentes del palmitato

La síntesis y modificación del palmitato, da cuenta de la biosíntesis de la mayor parte de los ácidos grasos en el cuerpo humano, especialmente los implicados en el almacenamiento de energía. No obstante, se necesitan pequeñas cantidades de diferentes ácidos grasos con fines estructurales o funcionales específicos. Estos ácidos son producidos por modificación del proceso llevado a cabo por la ácido graso sintasa. Dos ejemplos de ello son la producción de ácidos grasos más cortos que el palmitato en la glándula mamaria, y la síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada en ciertas glándulas secretoras.

La leche producida por muchos animales contiene cantidades variables de ácidos grasos con longitudes de cadena más cortas que el palmitato. Las cantidades producidas por la **glándula mamaria** varían con la especie y sobre todo con el estado fi-

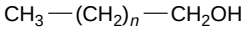
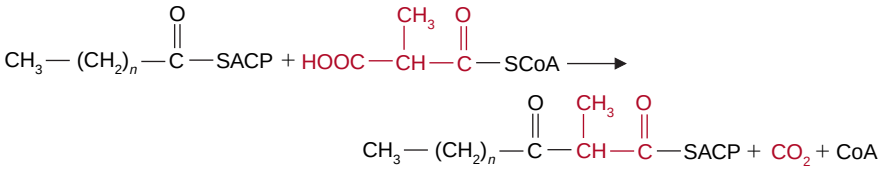


FIGURA 16.13
Alcohol graso.

siológico del animal. Esto se da probablemente en la especie humana, aunque la mayor parte de las investigaciones se han realizado con ratas, conejos y varios rumiantes. La misma ácido graso sintasa que produce palmitato sintetiza ácidos más cortos cuando la unión de la cadena creciente con la proteína portadora de acilo se rompe antes de que se complete la cadena de 16 carbonos. Esta hidrólisis es producida por **tioesterasas** solubles, cuya actividad se encuentra bajo control hormonal.

Existen relativamente pocos ácidos grasos de cadena ramificada en los animales superiores. Hasta hace muy poco tiempo el metabolismo de estos ácidos grasos se había estudiado mayoritariamente en especies primitivas tales como micobacterias, donde están presentes en mayor variedad y cantidad. Los ácidos grasos sencillos de cadena ramificada son sintetizados por los tejidos de los animales superiores con fines específicos, tales como la producción de ceras en glándulas sebáceas y glándulas de limpieza de las plumas de las aves, así como la elaboración de estructuras en los sistemas localizadores de eco de las marsopas.

La mayoría de los ácidos grasos ramificados de los animales superiores son derivados metilados de ácidos grasos lineales saturados, y son sintetizados por la ácido graso sintasa. Cuando se utiliza **metilmalonil CoA** como sustrato en lugar de malonil CoA, se inserta una cadena lateral de metilo en el ácido graso, lo que da la siguiente reacción:



A continuación se producen los pasos reductores normales. En muchos tejidos estas reacciones se llevan a cabo normalmente a una velocidad menor en varios órdenes de magnitud que la utilización de malonil CoA para producir palmitato. La proporción de ácidos grasos ramificados sintetizados está mayoritariamente gobernada por la disponibilidad relativa de los dos precursores, pudiendo así tener lugar un incremento de la ramificación al disminuir la proporción de malonil-CoA a metilmalonil CoA. En muchos tejidos, existe una malonil-CoA descarboxilasa capaz de provocar este descenso. Se ha sugerido que los niveles elevados de metilmalonil CoA que se dan en ciertas situaciones patológicas, tales como la deficiencia de vitamina B_{12}, pueden conducir a una producción excesiva de ácidos grasos ramificados.

Los acil CoA grasos pueden reducirse hasta alcoholes grasos

Tal como se discute en el Capítulo 17 (véase p. 740), muchos fosfolípidos contienen cadenas de ácidos grasos unidas por enlace éter en lugar de enlace éster. Los precursores biosintéticos de estas cadenas unidas por enlace éter son **alcoholes grasos** (Figura 16.13), en lugar de ácidos grasos. Estos alcoholes se forman en los animales superiores en el retículo endoplasmático a partir de los acil CoA grasos, mediante una reducción en dos pasos ligada al NADPH. En los tejidos que producen cantidades relativamente grandes de lípidos que contengan enlaces éter, la producción concurrente de ácidos grasos y alcoholes grasos está probablemente coordinada de manera muy estrecha.

16.4 | ALMACENAMIENTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN FORMA DE TRIACILGLICEROLES

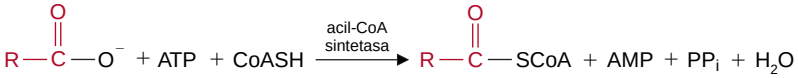
La mayor parte de los tejidos del cuerpo pueden convertir los ácidos grasos en triacilgliceroles mediante una secuencia común de reacciones, pero son el hígado y el tejido adiposo los que realizan este proceso en mayor proporción. El tejido adiposo es un tejido conjuntivo especializado, diseñado para la síntesis, almacenamiento e hidrólisis de triacilgliceroles. Este es el mecanismo principal que tiene el cuerpo humano para el almacenamiento de energía a largo plazo. Todo esto se refiere al tejido adiposo blanco, por oposición al tejido adiposo pardo, que está presente en cantidades mucho menores y que posee otras funciones especializadas. Los triacilgliceroles se almacenan en forma de gotitas líquidas en el citoplasma, aunque de ninguna manera se genera un "depósito muerto", ya que el recambio se produce en general con una vida media de sólo unos pocos días. Así, en una situación homeostática, tienen lugar una síntesis y degradación continuas de triacilgliceroles en el

tejido adiposo. También se produce algo de almacenamiento en los músculos esquelético y cardíaco, aunque solamente para consumo local.

La síntesis de triacilgliceroles en el hígado se utiliza principalmente para la producción de lipoproteínas sanguíneas, aunque los productos pueden servir como fuente de energía para el hígado. Los ácidos grasos necesarios pueden provenir de la dieta, del tejido adiposo por transporte sanguíneo o de biosíntesis *de novo*. El acetil CoA para la biosíntesis proviene principalmente del catabolismo de la glucosa.

En la mayoría de los tejidos los triacilgliceroles se sintetizan a partir de acil CoA grasos y glicerol 3-fosfato

Los triacilgliceroles se sintetizan en la mayoría de los tejidos a partir de ácidos grasos activados y de un producto del catabolismo de la glucosa, que puede ser el **glicerol 3-fosfato** o la **dihidroxiacetona fosfato** (véase Figura 16.14). El glicerol 3-fosfato se forma bien por reducción de la dihidroxiacetona fosfato producida en la glucólisis, bien por fosforilación del glicerol. En el tejido adiposo blanco no existe, o existe poca, glicerol quinasa, por lo que el glicerol fosfato se ha de suministrar a partir de intermediarios glucolíticos. Los ácidos grasos son activados por conversión en sus ésteres con el CoA según la siguiente reacción:



Ésta es una reacción en dos pasos con un acil adenilato como intermedio, y está impulsada por la hidrólisis del pirofosfato a P_i.

La síntesis de triacilgliceroles implica la formación de **ácido fosfatídico**, que es un intermediario clave también en la síntesis de otros lípidos (véase Capítulo 17, p. 734). Este ácido puede formarse por dos acilaciones secuenciales del glicerol 3-fosfato, tal como se muestra en la Figura 16.15. Alternativamente, la

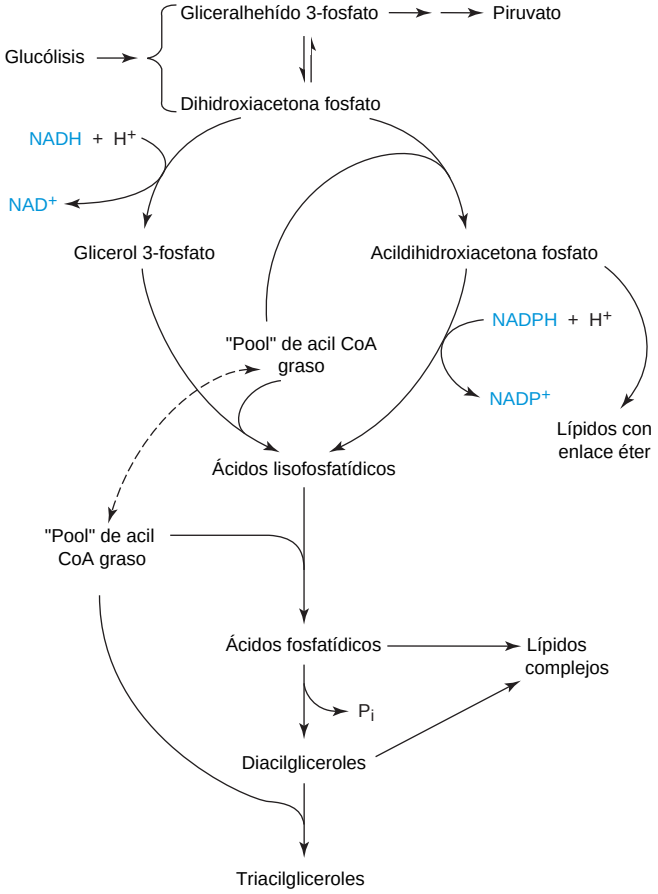


FIGURA 16.14
Rutas alternativas para la biosíntesis de triacilgliceroles a partir de la dihidroxiacetona fosfato.

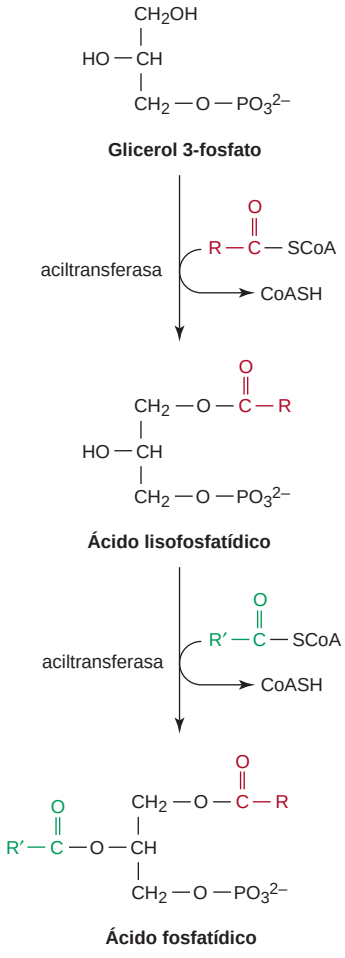


FIGURA 16.15
Síntesis de ácido fosfatídico a partir de glicerol 3-fosfato.

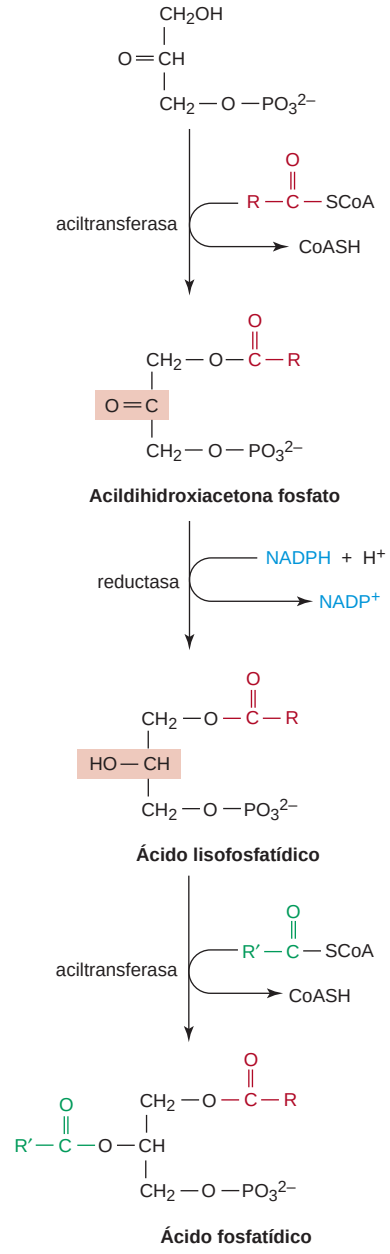


FIGURA 16.16
Síntesis de ácido fosfatídico a partir de dihidroxiacetona fosfato.

dihidroxiacetona fosfato puede acilarse directamente en el carbono 1 y a continuación reducirse en el carbono 2. Como se ilustra en la Figura 16.16, el ácido lisofosfatídico resultante puede esterificarse a continuación. Si el ácido fosfatídico proveniente de cualquiera de estas rutas es utilizado para la síntesis de triacilgliceroles, entonces se hidroliza a continuación el grupo fosfato por la **fosfatidato fosfatasa** para dar diacilglicerol, que es entonces acilado seguidamente a triacilglicerol (Figura 16.17)

En las células de la mucosa intestinal la síntesis de triacilglicerol no requiere la formación del ácido fosfatídico en la forma anteriormente descrita. Un producto principal de la digestión intestinal de los lípidos son los 2-monoacilgliceroles, que son absorbidos como tales por las células de la mucosa. En estas células existe un enzima que cataliza la acilación de estos monoacilgliceroles con acil CoA, formando así 1,2-diacilgliceroles que pueden ser acilados de nuevo.

La especificidad de la acilación de todas estas reacciones está aún sujeta a controversia. El análisis de los **patrones de ácidos grasos** en los triacilgliceroles de varios tejidos humanos muestra que la distribución de los diferentes ácidos sobre las tres posiciones del glicerol no se produce al azar ni es absolutamente específica. Los patrones de los diversos tejidos son diferentes. El ácido palmítico tiende a concentrarse en la posición 1, y el ácido oleico en las posiciones 2 y 3 de los triacilgliceroles del tejido adiposo humano. Dos factores principales que determinan la posición de un ácido graso dado en una posición determinada del glicerol son la especificidad de la aciltransferasa implicada y la disponibilidad relativa de los diferentes ácidos grasos en el "pool" de acil CoA grasos. También están implicados en ello otros factores, pero su importancia relativa aún está por determinar.

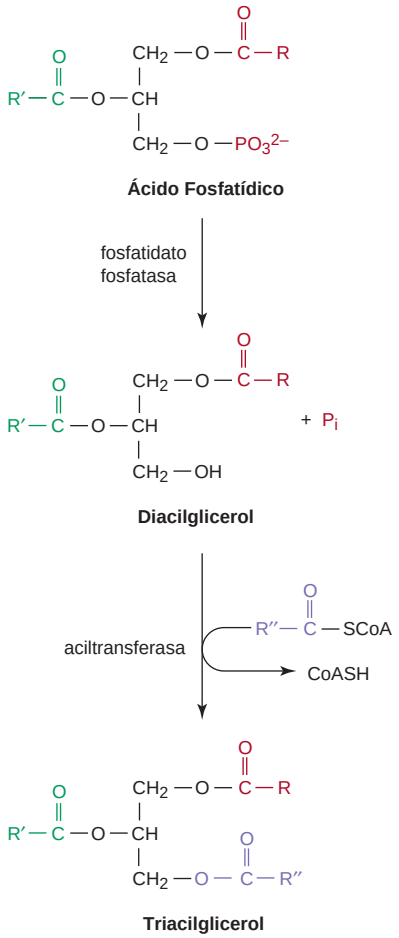
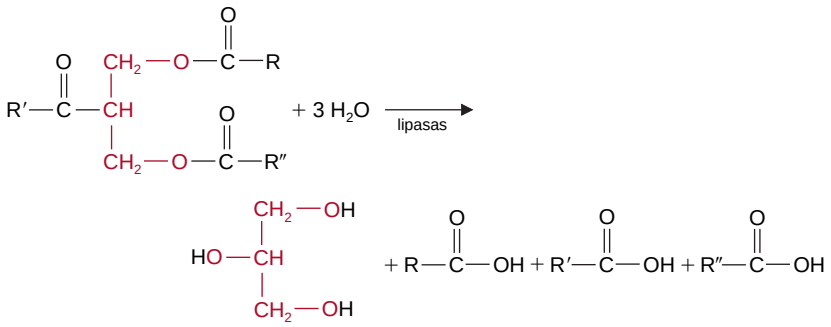


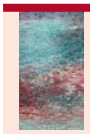
FIGURA 16.17
Síntesis de triacilglicerol a partir de ácido fosfatídico.

La movilización de triacilgliceroles requiere hidrólisis

El primer paso en la recuperación de los ácidos grasos almacenados para la producción de energía es la hidrólisis de los triacilgliceroles. Esta reacción está catalizada por una serie de lipasas, dependiendo la secuencia de hidrólisis de las tres posiciones del glicerol de las especificidades de las lipasas concretas implicadas.



Las lipasas del tejido adiposo son los enzimas clave para la liberación de los almacenes principales de energía y la lipasa que libera el primer ácido graso está sometida a control siendo una **lipasa sensible a hormonas**. Este control de la hidrólisis de triacilgliceroles debe guardar un equilibrio con el proceso de la síntesis de triacilgliceroles para así poder asegurar unos depósitos energéticos adecuados y evitar la obesidad (Aplis. Clíns. 16.1 y 16.2). Los ácidos grasos y el glicerol producidos por las lipasas del tejido adiposo se liberan a la sangre circulante, en donde los ácidos grasos se unen a la albúmina sérica y son transportados a los tejidos para su uso. El glicerol vuelve al hígado, en donde se convierte en dihidroxiacetona fosfato y entra en la vía glucolítica o gluconeogénica.



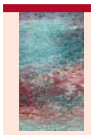
APLICACIÓN CLÍNICA 16.1
Obesidad

Los términos obesidad y sobrepeso hacen referencia a un exceso de peso corporal con respecto a la altura. Las definiciones son arbitrarias y se basan en estimaciones actuariales del peso corporal ideal (PCI), es decir, del peso corporal asociado con la tasa de mortalidad y de enfermedades más reducida. El peso relativo es el peso corporal con respecto al PCI: el sobrepeso se define como el peso relativo que supera hasta en un 20% al normal, y la obesidad es el peso relativo que excede al PCI en más de un 20%. El índice de masa corporal (IMC) está correlacionado con las cantidades de grasa corporal, y se define como peso (kg) dividido por altura^2 (m^2). El sobrepeso se define como un IMC de unos 25–30 kg por m^2, y la obesidad, como un IMC de más de 30 kg por m^2. Otra forma de medir los depósitos de grasa corporal es calcular el grosor de los pliegues de la piel.

Aún se desconoce la causa de la mayoría de los casos de obesidad. Los trastornos endocrinos, tales como el hipotiroidismo o la enfermedad de Cushing (sobreproducción de corticosteroides) son causas poco frecuentes. Igualmente son raras las mutaciones en los genes que codifican la recién descubierta hormona leptina, o su receptor (véase Apli. Clín. 16.2). Los factores ambientales se unen a los factores genéticos: un 80% de los niños con los dos padres obesos serán obesos, mientras que si los padres tienen un peso normal, esta cifra se reduce a un 14%. El mecanismo principal para ganar peso es el consumo de un exceso de calorías con respecto a las necesidades energéticas diarias, pero los procesos normales que regulan la ingestión de comida y la disipación de energía no se conocen demasiado bien. En raras ocasiones, los tumores en el hipotálamo provocan una ingestión patológica de alimentos (hiperfagia). Con todo, en la mayoría de los casos de obesidad no se ha podido demostrar ningún defecto específico.

El tratamiento de la obesidad, un problemas de proporciones epidémicas en los países desarrollados, implica restricciones en la dieta, un incremento de la actividad física y un cambio en las costumbres. El problema real es modificar los patrones nutricionales de los pacientes a largo plazo, ya que el peso perdido suele recuperarse. Actualmente, no existe ningún fármaco que asegure el control del peso a largo plazo. La cirugía, que se emplea para reducir el tamaño del estómago de los pacientes, puede utilizarse con pacientes que superen el PCI en más de un 100%. Entre las complicaciones médicas de la obesidad se incluyen un incremento de dos a tres veces en la hipertensión, cálculos de la vesícula y diabetes y un aumento de cinco veces en el riesgo de desarrollar un carcinoma de endometrio. Los niveles de antibrombina III plasmática disminuyen en los obesos, lo que les predispone a padecer una trombosis coronaria (véase Apli. Clín. 15.12).

Bray, G. A. Complications of obesity. *Ann. Intern. Med.* 103:1052, 1985; y Bray, G. A. The syndromes of obesity: an endocrine approach. En: L. J. DeGroot (Ed.), *Endocrinology,* Vol. 3, 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1995, p. 2624.



APLICACIÓN CLÍNICA 16.2

Leptina y obesidad

En 1994 fueron identificados el gen *OB* de ratón, su producto proteico, y sus homólogos humanos. El gen humano codifica un polipéptido de 166 aminoácidos que se expresa en el tejido adiposo de forma proporcional a la gravedad de la obesidad. La proteína secretada, denominada leptina, contiene 146 aminoácidos, puede ser determinada por inmunoensayo, y es altamente homóloga a la proteína murina.

Los ratones de una cepa ob/ob que heredan una mutación sin sentido en el gen de la leptina, que da lugar a una proteína truncada de 104 aminoácidos que no es secretada, son obesos, diabéticos, y muestran una actividad, metabolismo y temperatura corporal reducidos. La inyección de leptina recombinante en ratones homocigóticos para esta mutación, rebajó su consumo de comida, peso corporal, porcentaje de grasa corporal y las concentraciones séricas de glucosa e insulina, e incrementó su tasa metabólica, temperatura corporal y nivel de actividad.

Un fenotipo similar al de los ratones ob/ob se encuentra también en ratones db/db y ratas Zucker fa/fa. Los dos son portadores de una mutación en el gen del receptor de la leptina que produce la pérdida de función de esta proteína. Tal como era de esperar su obesidad masiva y su hipometabolismo no responden a la administración de leptina.

Recientemente se han encontrado defectos congénitos en los genes de leptina y/o de su receptor que son responsables de la hiperfagia extrema y obesidad masiva en algunos individuos humanos. Uno de ellos era una chica joven con un peso ~200 libras (~90 kg) a la edad de 8 años y que era homocigoto en una mutación del gen de la leptina que impedía la producción de una molécula de leptina funcional. El tratamiento de esta paciente con leptina normal provocó una inversión espectacular de su hiperfagia y ganancia de peso. No obstante, dado que la mayoría de individuos obesos producen leptina y receptores de leptina normales su tendencia a comer en exceso y/o ganar peso excesivo debe provenir de alguna otra anormalidad. Una posibilidad es que sean resistentes a la señalización de leptina en el hipotálamo en un punto lejano de la interacción leptina-receptor de leptina.

Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L. et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334:292, 1996; Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M. et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632, 1996; y Farooqi, I. S., Jebb, S. A., Langmack, G. et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.* 341:879, 1999.

16.5 MÉTODOS DE TRANSPORTE DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y DE SUS PRODUCTOS PRIMARIOS ENTRE ÓRGANOS

La energía basada en lípidos se transporta por la sangre de diversas formas

La energía disponible de los ácidos grasos ha de ser distribuida a través del cuerpo desde el lugar de su absorción, biosíntesis o almacenamiento, a los tejidos funcionales que consumen esta energía. Este transporte está estrechamente integrado con el transporte de otros lípidos, especialmente el colesterol, y está íntimamente involucrado en los procesos patológicos que conducen a la ateroesclerosis.

El cuerpo humano utiliza tres tipos de sustancias como vehículos para transportar la energía contenida en los lípidos: (1) quilomicrones y otras lipoproteínas plasmáticas, en los que los triacilgliceroles son transportados en gotículas de lípidos recubiertos por proteína, conteniendo ambos otros lípidos; (2) ácidos grasos unidos a la albúmina sérica; y (3) los denominados cuerpos cetónicos, acetoacetato y β-hidroxibutirato. Estos tres vehículos se utilizan en proporciones variables para transportar la energía en el torrente circulatorio por tres rutas. Una es el transporte como quilomicrones de los triacilgliceroles de la dieta a través del cuerpo, desde el intestino y después de la absorción. Otra es el transporte de energía contenida en los lípidos modificados o sintetizados en el hígado y distribuidos, bien al tejido adiposo para su almacenamiento, bien a otros tejidos para su utilización. Este segundo proceso incluye los "cuerpos cetónicos" y lipoproteínas plasmáticas que no sean quilomicrones. Finalmente, hay el transporte de energía liberada de los depósitos del tejido adiposo al resto del cuerpo en forma de ácidos grasos ligados a la albúmina sérica.

Las proporciones de energía transportadas por cualquiera de los modos esbozados anteriormente varían considerablemente según el estado metabólico y fisiológico. En todo momento, la mayor cantidad de lípido contenida en la sangre se encuentra en forma de triacilgliceroles presentes en las diversas lipoproteínas. No obstante, los ácidos grasos ligados a la albúmina se utilizan y reemplazan muy rápidamente, por lo que la energía total transportada de este modo en un período de tiempo determinado puede ser muy significativa.

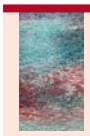
Las lipoproteínas plasmáticas transportan triacilgliceroles y otros lípidos

Las lipoproteínas plasmáticas se sintetizan tanto en el intestino como en el hígado, y son un grupo heterogéneo de complejos lípido–proteína compuesto por diversos ti-

pos de lípidos y apoproteínas (en la p. 127 se expone detalladamente su estructura). Los dos vehículos más importantes para el suministro de energía a partir de lípidos son los **quilomicrones** y la **lipoproteína de muy baja densidad (VLDL),** ya que ambas contienen una cantidad relativamente elevada de triacilgliceroles. Los quilomicrones se forman en el intestino e intervienen en la absorción y transporte de triacilgliceroles, colesterol y vitaminas liposolubles procedentes de la dieta. La relación exacta precursor–producto entre los otros tipos de lipoproteínas plasmáticas está aún por definir completamente, lo mismo que el papel de diversos componentes proteicos. El hígado sintetiza VLDL y los ácidos grasos de los triacilgliceroles en la VLDL son captados por el tejido adiposo y otros tejidos. En este proceso, las VLDL se convierten en **lipoproteínas de baja densidad (LDL)**. El papel de las **lipoproteínas de alta densidad (HDL)** en el transporte de energía basada en los lípidos está aún por clarificar. Todas estas lipoproteínas están implicadas en forma integral en el transporte de otros lípidos, especialmente del colesterol. En cierta medida, los componentes lipídicos pueden intercambiarse entre los diferentes tipos de lipoproteínas, y es probable que alguna de las apoproteínas desempeñe papeles funcionales en la modificación de la actividad enzimática durante el intercambio de lípidos entre las lipoproteínas plasmáticas y los tejidos. Otras apoproteínas actúan como sitios específicos de reconocimiento de receptores de la superficie celular. Esta interacción representa el primer paso de la endocitosis mediada por receptor de determinadas lipoproteínas. En la p. 745 se presenta una discusión detallada de la función de las lipoproteínas plasmáticas. El estudio de algunas anomalías genéticas raras ha sido de gran ayuda a la hora de dilucidar el papel de algunas de estas apoproteínas (Apli. Clín. 16.3).

Los ácidos grasos se unen a la albúmina sérica

La albúmina sérica actúa como transportador en la sangre de una serie de sustancias, entre las que se cuentan los ácidos grasos como una de las más importantes. Estos ácidos son insolubles en agua por sí mismos, pero cuando se liberan en el plasma durante la hidrólisis de los triacilgliceroles se unen rápidamente a la albúmina. Esta proteína tiene diversos centros de fijación para los ácidos grasos, algunos de los cuales son de alta afinidad. La saturación de la albúmina con ácidos grasos dista mucho de ser la máxima, pero dado que el recambio de estos ácidos grasos es elevado, la fijación mediante este mecanismo constituye una ruta importante de transferencia de energía.



APLICACIÓN CLÍNICA 16.3
Anormalidades genéticas en el transporte de energía en forma de lípidos

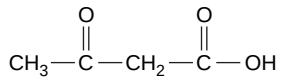
Las enfermedades que afectan al transporte de energía basada en lípidos dan lugar frecuentemente a niveles plasmáticos anormalmente elevados de triacilgliceroles, colesterol, o ambos simultáneamente. Se clasifican como hiperlipidemias. Algunas se transmiten genéticamente, y provienen probablemente de una alteración o falta de una o más proteínas implicadas en la producción o elaboración de los lípidos plasmáticos. La naturaleza y función de todas estas proteínas está todavía por determinar, por lo que la elucidación de las causas exactas de la patología en muchas de estas enfermedades se encuentra en sus etapas iniciales. Sin embargo, en varios casos se ha podido asociar una anormalidad específica de una proteína con el transporte alterado de lípidos en el plasma de los pacientes.

En la enfermedad extremadamente rara analbuminemia, se produce una falta casi completa de albúmina sérica. En una estirpe de ratas con analbuminemia, la deleción de 7 pares de bases en un intrón del gen de la albúmina tiene como resultado la incapacidad de madurar el mRNA nuclear de la albúmina. A pesar de la multitud de funciones de esta proteína, los síntomas de esta enfermedad son sorprendentemente suaves. La falta de albúmina sérica elimina efectivamente el transporte de ácidos grasos, a menos que éstos estén estrificados en forma de acilgliceroles o lípidos complejos. No obstante, como los pacientes con analbuminemia tienen niveles plasmáticos elevados de triacilgliceroles, es posible que la deficiencia en el transporte de energía basada en lípidos causada por la falta de albúmina para transportar los ácidos grasos, sea cubierta por una mayor utilización de las lipoproteínas plasmáticas para transportar triacilgliceroles.

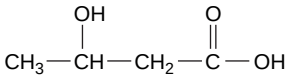
Otro defecto genético más grave es la ausencia de lipoproteína lipasa. El problema principal en este caso es la incapacidad para procesar los quilomicrones después de una comida grasa. Se producen depósitos de grasa patológicos en la piel (xantomas eruptivos) y los pacientes sufren típicamente de pancreatitis. Si los pacientes se someten a una dieta baja en grasas responden razonablemente bien.

Otra enfermedad rara, pero más grave, es la abetalipoproteinemia, causada por una síntesis defectuosa de la apoproteína B, componente esencial de la formación de los quilomicrones y las VLDL. En estas circunstancias, la ruta principal para el transporte de la energía basada en lípidos de la dieta al cuerpo no es utilizable. Los quilomicrones, VLDL y LDL están ausentes del plasma, por lo que la absorción de grasa es deficiente o inexistente. Existen otros síntomas graves, entre los que se incluyen la neuropatía y la deformación de los eritrocitos, cuya etiología es menos clara.

Havel, R. J. y Kane, J. P. Structure and metabolism of plasma lipoproteins. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* Vol. II, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 1841; y Brunzell, J. D. Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* Vol. II, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 1913.



Ácido acetoacético



Ácido β-hidroxibutírico

FIGURA 16.18
Estructura de los cuerpos cetónicos.

Los cuerpos cetónicos constituyen una fuente de energía basada en los lípidos

El tercer modo de transporte de moléculas que dan energía basada en lípidos se da en la forma de pequeñas moléculas hidrosolubles, principalmente **acetoacetato** y **β-hidroxibutirato** (Figura 16.18), que se producen fundamentalmente en el hígado durante la oxidación de los ácidos grasos. Las reacciones implicadas en su formación y utilización se tratan en una sección posterior. En determinadas circunstancias, estas sustancias pueden alcanzar concentraciones excesivas en la sangre, lo que conduce a cetosis y acidosis. También tiene lugar una cierta descarboxilación espontánea del acetoacetato a **acetona** que puede detectarse a través del olor de la acetona en el aliento cuando las concentraciones de acetoacetato son elevadas. Esto condujo a los primeros investigadores a denominar a este grupo de productos solubles "cuerpos cetónicos". De hecho, el β-hidroxibutirato y el acetoacetato son producidos continuamente por el hígado, y en menor cuantía por el riñón. Los músculos esquelético y cardíaco los utilizan para producir ATP. El tejido nervioso, que obtiene casi toda su energía de la glucosa, es incapaz de captar y utilizar ácidos grasos ligados a la albúmina para la producción de energía. Sin embargo, puede utilizar los cuerpos cetónicos cuando el suministro de glucosa es insuficiente tal como sucede en el ayuno prolongado o en la inanición.

Las lipasas hidrolizan los triacilgliceroles de la sangre para que sus ácidos grasos puedan transferirse a los tejidos

Los ácidos grasos ligados a la albúmina y los cuerpos cetónicos son captados fácilmente por varios tejidos para su oxidación y producción de ATP. Sin embargo, la energía de los ácidos grasos almacenados o circulantes en forma de triacilgliceroles no es asequible directamente, sino que estos últimos compuestos han de hidrolizarse enzimáticamente para liberar los acidos grasos y el glicerol. La **lipoproteína lipasa** hidroliza los triacilgliceroles de las lipoproteínas plasmáticas. La lipoproteína lipasa está localizada en la superficie de las células endoteliales de los capilares y, posiblemente, también de las células de los tejidos adyacentes. Hidroliza los ácidos grasos de las posiciones 1 y/o 3 de los tri y diacilgliceroles presentes en las VLDL o en los quilomicrones. Para activar el proceso ha de hallarse presente una de las apoproteínas de las lipoproteínas (ApoC-II). Los ácidos grasos que se liberan se unen a la albúmina sérica, o son captados por el tejido. Los productos monoacilgliceroles pueden pasar a las células o sufrir otra hidrólisis por la **monoacilglicerol hidrolasa** sérica.

Un tipo de lipasa completamente diferente controla la movilización de los ácidos grasos de los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo. Una de ellas, la **triacilglicerol lipasa sensible a hormonas**, está controlada por un mecanismo mediado por el cAMP. Existen otras lipasas en el tejido, pero el proceso se inicia con el enzima que ataca a los triacilgliceroles. A continuación, otras dos lipasas completan rápidamente la hidrólisis de los mono- y diacilgliceroles, liberando ácidos grasos al plasma, en donde éstos se unen a la albúmina sérica. El metabolismo de los triacilgliceroles está fuertemente controlado por hormonas y por los cofactores requeridos. Algunos de los factores reguladores clave se presentan en la Tabla 16.3.

TABLA 16.3 Regulación del metabolismo de los triacilgliceroles

Enzima	*Agente regulador*	*Efecto*
	Movilización de los triacilgliceroles	
"Lipasa sensible a hormonas"	"Hormonas lipolíticas", p. ej., adrenalina, glucagón y ACTH	Estimulación mediante fosforilación mediada por el cAMP de enzimas relativamente inactivos
	Insulina	Inhibición
	Prostaglandinas	Inhibición
Lipoproteína lipasa	Apolipoproteína C-II	Activación
	Insulina	Activación
	Biosíntesis de triacilgliceroles	
Fosfatidato fosfatasa	Hormonas esteroides	Estimulación por mayor síntesis del enzima

16.6 UTILIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA

Los ácidos grasos que llegan a la superficie de las células son captados y utilizados para la producción de energía principalmente en las mitocondrias, en un proceso que está integrado íntimamente con los procesos de producción de energía a partir de otras fuentes. Los intermediarios de alto contenido energético producidos a partir de los ácidos grasos son los mismos que los obtenidos a partir de los azúcares, es decir, NADH y $FADH_2$, y las etapas finales del proceso de oxidación son exactamente las mismas que para los glúcidos, a saber, el metabolismo del acetil CoA mediante el ciclo TCA, y la producción de ATP en el sistema de transporte electrónico mitocondrial.

El grado de utilización de los ácidos grasos para la producción de energía varía considerablemente de tejido a tejido, y depende en buena medida del estado metabólico del cuerpo, esto es, si está bien nutrido o en ayunas, si está realizando ejercicio o en reposo. Por ejemplo, el tejido nervioso oxida los ácidos grasos en grado mínimo, si es que realmente llega a hacerlo, pero los músculos cardíaco y esquelético dependen enormemente de los ácidos grasos como fuente de energía principal. Durante el ayuno prolongado, la mayoría de los tejidos pueden utilizar ácidos grasos o cuerpos cetónicos para sus requerimientos energéticos.

La β-oxidación de los ácidos grasos lineales es el principal proceso productor de energía

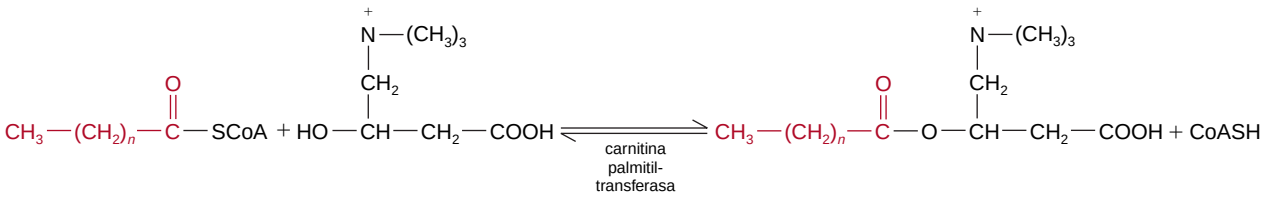
En su mayor parte, los ácidos grasos se oxidan mediante un mecanismo que es similar, aunque no idéntico, al inverso del proceso de la síntesis del palmitato. Esto es, se eliminan fragmentos bicarbonados secuencialmente desde el extremo carboxilo del ácido después de pasos de **deshidrogenación**, **hidratación** y **oxidación**, para formar un β-cetoácido, que es escindido por **tiólisis**. Durante estos procesos, el ácido está activado formando un enlace tioéster con la 4′-fosfopanteteína del CoA.

Los ácidos grasos se activan mediante conversión en acil CoA graso

El primer paso de la oxidación de un ácido graso es su activación a acil CoA graso. Esta es la misma reacción que la descrita para la síntesis de triacilgliceroles en la Sección 16.4 (véase p.707), y tiene lugar en el retículo endoplasmático o en la membrana mitocondrial externa.

La carnitina transporta grupos acilo a través de la membrana mitocondrial interna

Mientras que la mayor parte de los acil CoA grasos se forman fuera de la mitocondria, la maquinaria oxidativa se encuentra en el interior de la membrana interna, que es impermeable al CoA y a sus derivados. La célula soluciona este problema utilizando la **carnitina (4-trimetilamino-3-hidroxibutirato)** como transportador de los grupos acilo a través de la membrana. En la Figura 16.19 se esbozan los pasos implicados. A ambos lados de la membrana hay enzimas que transfieren el grupo acilo graso entre el CoA y la carnitina.



En la membrana mitocondrial externa, el grupo acilo es transferido a la carnitina gracias a la catálisis por la **carnitina palmitiltransferasa I (CPT I)**. La acil carnitina es entonces intercambiada por carnitina libre a través de la membrana mitocondrial interna, por una carnitina–acilcarnitina translocasa antiparalela. Finalmente, el grupo acil graso es transferido de nuevo al CoA por la **carnitina palmitiltransferasa II (CPT II)** localizada en la cara de la membrana interna correspondiente a la matriz. Este proceso se da fundamentalmente en el transporte mitocondrial de acil graso CoA de 12 a 18 átomos de carbono. Las anomalías genéticas en este sistema conducen a

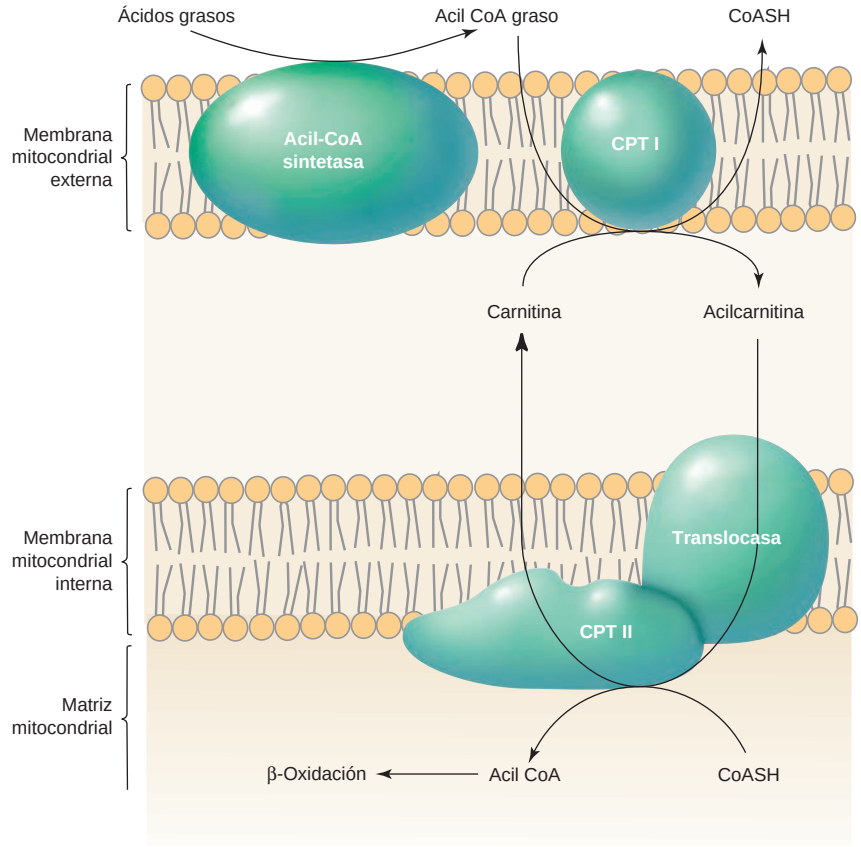


FIGURA 16.19
Mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde el citosol a través de la membrana mitocondrial interna para su oxidación.

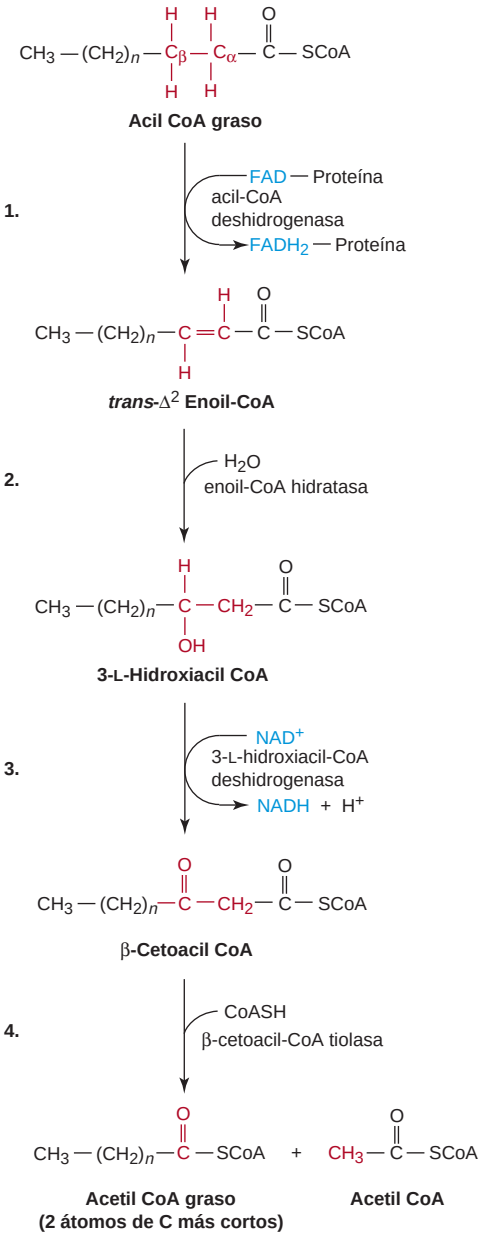


FIGURA 16.20
Ruta de la *β*-oxidación de los ácidos grasos.

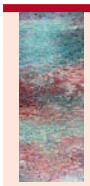
patología grave (Apli. Clín. 16.4). En cambio, la entrada de los ácidos grasos de cadena corta es independiente de la carnitina ya que pueden cruzar la membrana mitocondrial interna y ser activados con el CoA en la matriz mitocondrial.

La β-oxidación es una secuencia de cuatro reacciones

Las cuatro reacciones que constituyen la *β*-oxidación se presentan en la Figura 16.20. Una vez que se ha formado el acil CoA graso en la superficie interior de la membrana mitocondrial interna, pueden ser oxidados por la acil-CoA deshidrogenasa, flavoproteína que utiliza FAD como aceptor electrónico (reacción 1). Los productos son enoil CoA con un doble enlace trans entre los átomos C-2 y C-3 y $FADH_2$ unido al enzima. Al igual que en el caso del ciclo TCA, el $FADH_2$ transfiere sus electrones a través de la cadena de transporte electrónico regenerando el FAD.

El segundo paso de la *β*-oxidación es la hidratación del doble enlace trans a un **3-L-hidroxiacil CoA**. Esta reacción es estereoespecífica, en el sentido de que el producto de la hidratación del doble enlace trans es el isómero L. La estereoespecificidad de la ruta oxidativa está gobernada por el enzima que cataliza la tercera reacción, que es específico para el isómero L como sustrato. El paso final es la rotura del fragmento bicarbonado por una tiolasa. En el proceso global se produce, pues, un acetil CoA y el producto acil CoA está listo para una nueva ronda de oxidación, empezando con la acil-CoA deshidrogenasa.

Cada una de las cuatro reacciones mostradas en la Figura 16.20 está catalizada por varios enzimas diferentes con especificidades que varían según la longitud de la cadena del acil CoA. Por ejemplo, en el primer paso de deshidrogenación intervienen al menos cuatro enzimas. A éstos se les conoce como acil-CoA deshidrogenasas de cadena muy larga, de cadena larga, de cadena media y de cadena corta (**VLCAD, LCAD, MCAD** y **SCAD**, de sus iniciales en inglés). La VLCAD, que según se cree actúa sobre acil CoA lineales que van de C-12 a C-24, difiere de los demás miembros de la familia en que está asociada a la membrana. La MCAD tiene una especificidad amplia para la longitud de cadena pero su máximo de actividad



APLICACIÓN CLÍNICA 16.4

Deficiencias genéticas en el transporte por carnitina o en la carnitina palmitil transferasa

Diversas enfermedades están causadas por anormalidades genéticas en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna. Su origen son deficiencias en el nivel de carnitina o en el funcionamiento del sistema enzimático de la carnitina palmitil transferasa (CPT).

Los síntomas clínicos de la deficiencia de carnitina varían desde el calambre muscular recurrente leve, hasta la debilidad grave y la muerte. Actualmente se reconocen dos categorías diferentes, primaria y secundaria, del trastorno. La deficiencia primaria de carnitina está producida por un defecto en el transportador de carnitina de membrana plasmática de alta afinidad en tejidos tales como el músculo, riñón, corazón y fibroblastos (pero aparentemente no en el hígado, donde opera un transportador diferente). El resultado es un nivel extremadamente bajo de carnitina en los tejidos afectados y también en el plasma (debido a la falta de reabsorción de carnitina por los riñones). Los niveles muy bajos de carnitina en el músculo esquelético y cardíaco comprometen seriamente la oxidación de ácidos grasos de cadena larga. Una terapia por carnitina en la dieta, al elevar la concentración de carnitina en el plasma y forzar su entrada en los tejidos de manera inespecífica, es frecuentemente beneficiosa. La deficiencia secundaria de carnitina está a menudo asociada con defectos heredados en la ruta de la β-oxidación, que dan lugar a la acumulación de diversos acil CoA y, a su vez, de acilcarnitinas. Estos últimos compuestos pueden ser secretados en la orina (véase Apli. Clín. 16.5), eliminando así el *pool* de carnitina corporal; además, se cree que perjudican la absorción de carnitina libre por los tejidos.

La deficiencia de CPT presenta también diferentes entidades clínicas. La deficiencia más común deriva de mutaciones en el gen CPT II, que dan lugar a una pérdida parcial de la actividad del enzima. El paciente experimenta generalmente debilidad muscular durante el ejercicio prolongado, cuando el músculo depende fuertemente de los ácidos grasos como fuente de energía. Suele ir acompañada de mioglobinuria, debida a la rotura del tejido muscular. Este trastorno se denomina usualmente forma "muscular" de la deficiencia de CPT II. Las mutaciones que producen una pérdida más grave (90% o más) de la actividad de la CPT II pueden tener consecuencias serias en la infancia temprana. En general son precipitadas por períodos de ayuno, e incluyen hipoglucemia hipocetótica, hiperamonemia, disfunción cardíaca y, a veces, la muerte. Una mortalidad y morbilidad similares se hallan asociadas a mutaciones en el gen de la CPT I hepática. Hasta la fecha, solamente se han descrito unos pocos pacientes con deficiencia de CPT I hepática, siendo ello posiblemente una indicación de que la enfermedad es a menudo letal y ha quedado sin diagnosticar. Actualmente se sabe que la CPT I muscular es una isoforma diferente de la correspondiente al hígado, pero no se han descrito defectos en este gen hasta ahora.

El primer paciente con deficiencia en la carnitina–acilcarnitina translocasa fue descrito muy recientemente, en 1992. Las características clínicas incluían coma hipoglucémico intermitente, hiperamonemia, debilidad muscular y cardiomiopatía. La enfermedad resultó ser fatal a la edad de 3 años. Desde entonces se han descrito varios casos adicionales con sintomatología similar.

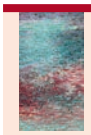
La clave en el tratamiento de todos los trastornos hereditarios del sistema de transporte de carnitina/CPT es evitar el ayuno y una dieta baja en ácidos grasos de cadena larga. Es beneficioso el aporte suplementario en la dieta de triacilgliceroles de cadena media cuyos ácidos grasos son oxidados por un mecanismo independiente de la carnitina.

Stanley, C. A., Hale, D. E., Berry, G. T., Deleeno, S., Boxer, J. y Bonnefont, J. P. A deficiency of carnitine–acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *N. Engl. J. Med.* 327:19, 1992; Roe, C. R. y Coates, P. M. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* Vol. II, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 1501; y Bonnefont, J.-P., Demaugre, F., Prip-Buus, C., Saudubray, J.-M., Brivet, M., Abadi, N. y Thuillier, L. Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol. Gen. Metab.* 68:424, 1999.

es, probablemente, para sustratos C-6 y C-8 mientras que el orden de preferencia para SCAD es $C_4 > C_6 > C_8$. En la actualidad se piensa que la LCAD está implicada principalmente en el inicio de la oxidación de ácidos grasos ramificados como, por ejemplo, 2-metilpalmitil CoA.

Otra característica que sólo se da en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga es que los pasos de la enoil-CoA hidratasa, la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y β-cetotiolasa están todos ellos catalizados por la **proteína trifuncional** ligada a la membrana. Ésta es diferente de los enzimas que catalizan las reacciones equivalentes en la oxidación de los acil CoA de cadena media o corta, todos los cuales son solubles y se encuentran en la matriz. La Apli. Clín. 16.5 describe defectos genéticos de acil-CoA deshidrogenasas.

Ha sido imposible demostrar de manera concluyente que cualquiera de los enzimas del esquema de la β-oxidación sean puntos de control, aunque en condiciones *in vitro* bastante rígidas, algunos presentan aparentemente velocidades máximas de reacción más lentas que las de otros. Se considera que el control se ejerce mediante la disponibilidad de sustratos y cofactores, así como por la velocidad de degradación del acetil CoA por el ciclo TCA. Una forma de controlar la disponibilidad de sustrato es por regulación del mecanismo de lanzadera de la carnitina que transporta los ácidos grasos al interior de la mitocondria. Así, en condiciones de abundancia de glúcidos (niveles de insulina elevados), los niveles tisulares de **malonil CoA**, el producto de la reacción de la acetil-CoA carboxilasa (véase p. 698), son elevados lo que conduce a la supresión de la actividad CPT 1 mitocondrial. Por el contrario, cuando descienden los niveles de insulina (inanición o diabetes incontrolada), se reduce el contenido ti-



APLICACIÓN CLÍNICA 16.5

Deficiencias genéticas en las acil-CoA deshidrogenasas

Las deficiencias genéticas en las acil-CoA deshidrogenasas representan un grupo de trastornos hereditarios descubiertos en fechas recientes, y que afectan a la β-oxidación de los ácidos grasos en diferentes fases del proceso de acortamiento de la cadena. El enzima afectado puede ser la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD), la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD), la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD) o la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD), con diferentes especificidades de sustrato (véase texto). Estas condiciones se heredan de forma autosómica recesiva y comparten numerosos rasgos clínicos. La deficiencia mejor caracterizada es la de MCAD, que, aunque no se reconoció hasta 1982, se considera actualmente que es uno de los más comunes entre los errores hereditarios del metabolismo.

La deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media aparece normalmente antes de los dos años de vida, y después de un período de doce horas de ayuno o más. Los síntomas típicos, que son vómitos, letargia y, con frecuencia, coma, van acompañados de una hipoglucemia hipocetótica y una aciduria dicarboxílica. La ausencia de la cetosis por inanición se debe a la interrupción de la oxidación de los ácidos grasos hepáticos, que también provoca una reducción de la gluconeogénesis. Este fenómeno, unido a una oxidación defectuosa de los ácidos grasos en los músculos, la cual favorece la utilización de la glucosa, provoca una fuerte hipoglucemia. La acumulación de acil CoA de cadena media en los tejidos obliga a su metabolismo a seguir rutas alternativas, que incluyen la ω-oxidación y la transesterificación con glicina o carnitina. La excreción urinaria excesiva de los productos de la reacción (ácidos dicarboxílicos de cadena media, junto con los ésteres de cadena media de glicina y carnitina) proporciona algunos indicios para el diagnóstico. La mayoría de los enfermos pueden llevar una vida normal con tan sólo evitar largos períodos de ayuno, lo que se corresponde con el hecho de que las complicaciones metabólicas de la deficiencia de MCAD aparecen únicamente cuando los tejidos corporales dependen en gran manera de los ácidos grasos como fuente de energía (esto es, después de haber agotado todos los glúcidos). Desde un punto de vista retrospectivo, es probable que muchos casos que en su momento se diagnosticaron como "síndrome parecido al de Reye" o "síndrome de la muerte súbita del recién nacido" se debieran, de hecho, a la deficiencia de MCAD.

Coates, P. M. y Tanaka, K. Molecular basis of mitochondrial fatty acid oxidation defects. *J. Lipid Res.* 33:1099, 1992; y Wanders, R. J. A., Vreken, P., den Boer, M. E. J. et al. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA β-oxidation. *J. Inher. Metab. Dis.* 22:442, 1999.

sular de malonil CoA, lo que permite que el flujo de ácidos grasos a través de la CPT 1 y de la ruta de la β-oxidación sea mayor. Este fenómeno es de importancia capital en la regulación de la producción hepática de cuerpos cetónicos (véase p. 720).

Rendimiento energético de la β-oxidación de los ácidos grasos

Cada conjunto de oxidaciones da lugar a la producción de un acetil CoA, una flavoproteína reducida y un NADH. En la oxidación del palmitil CoA tienen lugar siete escisiones y, en la última rotura, se forman dos acetil CoA. Los productos de la β-oxidación del palmitato son, por tanto, 8 acetil CoA, 7 flavoproteínas reducidas y 7 NADH. Cada una de las flavoproteínas reducidas puede proporcionar, según el conocimiento actual sobre los rendimientos de ATP en la fosforilación oxidativa (véase p. 578) 1,5 ATP, y cada uno de los NADH puede producir 2,5 cuando se oxidan a través de la cadena de transporte electrónico. Tal como se describió en el Capítulo 13 (véase p. 553), la oxidación de cada acetil CoA a través del ciclo TCA produce 10 ATP, por lo que los ocho fragmentos bicarbonados de una molécula de palmitato producen 80 ATP. Sin embargo, se utilizaron dos equivalentes de ATP (1 ATP que pasa a 1 AMP) para activar el palmitato a palmitil CoA. Por tanto, cada ácido palmítico que entra en la célula puede producir 106 ATP por mol mediante oxidación completa. La importancia del papel de los ácidos grasos en satisfacer las necesidades energéticas en la especie humana se trata en la p. 872.

Comparación del esquema de la β-oxidación con la biosíntesis del palmitato

En el metabolismo de las sustancias las reacciones de una ruta catabólica son a veces muy similares al inverso de la correspondiente vía anabólica, aunque hay mecanismos que proporcionan puntos de control separados para los dos esquemas. Esto sucede en el caso de la biosíntesis de ácidos grasos y su β-oxidación. En la Tabla 16.4 se señalan las diferencias críticas entre estas dos vías. Entre éstas se incluyen la separación por compartimentación subcelular (la β-oxidación tiene lugar en la mitocondria, mientras que la biosíntesis del palmitato se da en el citosol) y el uso de cofactores diferentes (NADPH en la biosíntesis y FAD y NAD^+ en la oxidación).

Algunos ácidos grasos requieren modificaciones de la β-oxidación para su metabolismo

El esquema de la β-oxidación da cuenta del grueso de la producción de energía a partir de ácidos grasos en el cuerpo humano. Sin embargo, estas reacciones deben estar

TABLA 16.4 Comparación de los esquemas de la biosíntesis y de la β-oxidación del palmitato

Parámetro	*Biosíntesis*	*β-oxidación*
Localización subcelular	Principalmente citosólica	Principalmente mitocondrial
Portador activo que contiene fosfopanteteína	Proteína portadora de acilo	Coenzima A
Naturaleza del fragmento carbonado pequeño añadido o sustraído	Carbonos 1 y 2 del malonil CoA después del cebado inicial	Acetil CoA
Naturaleza del coenzima de oxidación-reducción	NADPH	FAD cuando se deshidrogena una cadena saturada, NAD^+ cuando se deshidrogena un hidroxiácido
Configuración estereoquímica de los intermedios β-hidroxi	D-β-Hidroxi	L-β-Hidroxi
Equivalentes de energía producidos o utilizados en la interconversión de palmitato y acetil CoA	7 ATP + 14 NADPH = 49 equivalentes de ATP	7 $FADH_2$ + 7 NADH − 2 ATP = 28 equivalentes de ATP

complementadas con otros mecanismos para que se puedan oxidar los ácidos grasos de cadena impar e insaturados ingeridos. Además, hay reacciones que catalizan la α- y la ω-oxidación de los ácidos grasos. La **α-oxidación** tiene lugar en el carbono 2 en lugar del carbono 3, como es el caso del esquema de la β-oxidación. La **ω-oxidación** tiene lugar en el extremo metilo de la molécula de ácido graso. En el ser humano tiene lugar, posiblemente, la oxidación parcial de ácidos grasos con estructuras anulares de ciclopropano, si bien no se han podido descifrar sus mecanismos.

El propionil CoA es un producto de la oxidación de los ácidos grasos de cadena impar

La oxidación de los ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono tiene lugar de la misma manera en que se ha descrito anteriormente, con la diferencia de que el producto final es una molécula de propionil CoA (Figura 16.21). Para poder ser oxidado, este compuesto experimenta una carboxilación a metilmalonil CoA, un reordenamiento molecular y la conversión en succinil CoA. Estas reacciones son idénticas a las descritas en la p. 812 para el metabolismo del **propionil CoA**, cuando éste se forma como producto de la degradación metabólica de algunos aminoácidos.

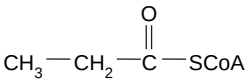


FIGURA 16.21
Propionil CoA.

La oxidación de ácidos grasos insaturados requiere otros enzimas

Muchos ácidos grasos insaturados de la dieta son asequibles para la producción de energía por el cuerpo humano. La oxidación del linoleil CoA, esquematizada en la Figura 16.22, ilustra dos reacciones especiales necesarias para la oxidación de los ácidos grasos insaturados. Uno de los problemas es que en la β-oxidación de los ácidos grasos insaturados el proceso de escisión secuencial de fragmentos bicarbonados puede generar un intermediario acil CoA con un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 en lugar de entre los carbonos 2 y 3, tal y como requiere la reacción de la enoil-CoA hidratasa. En este caso, el enlace cis entre los átomos de carbono 3 y 4 se isomeriza a un enlace trans entre los átomos de carbono 2 y 3 mediante un enzima auxiliar, la enoil-CoA isomerasa. A continuación, puede continuar el esquema regular.

Un segundo problema se produce cuando el doble enlace cis del intermediario acil CoA se sitúa entre los átomos de carbono 4 y 5. En ese caso, la acción de la acil-CoA deshidrogenasa provoca la aparición de un *trans*-2, *cis*-4 enoil CoA. Este es transformado por la 2,4 dienoil-CoA reductasa, que mediante el uso de equivalentes de reducción del NADPH, crea un *trans*-3-enoil CoA. Este último servirá como sustrato para la enoil-CoA isomerasa, que produce el *trans*-2-enoil CoA necesario para el ciclo siguiente de la β-oxidación.

Algunos ácidos grasos experimentan α-oxidación

Tal como se ha mencionado anteriormente, existen diversos mecanismos para la **hidroxilación de los ácidos grasos**. El que se ha expuesto previamente sirve para la

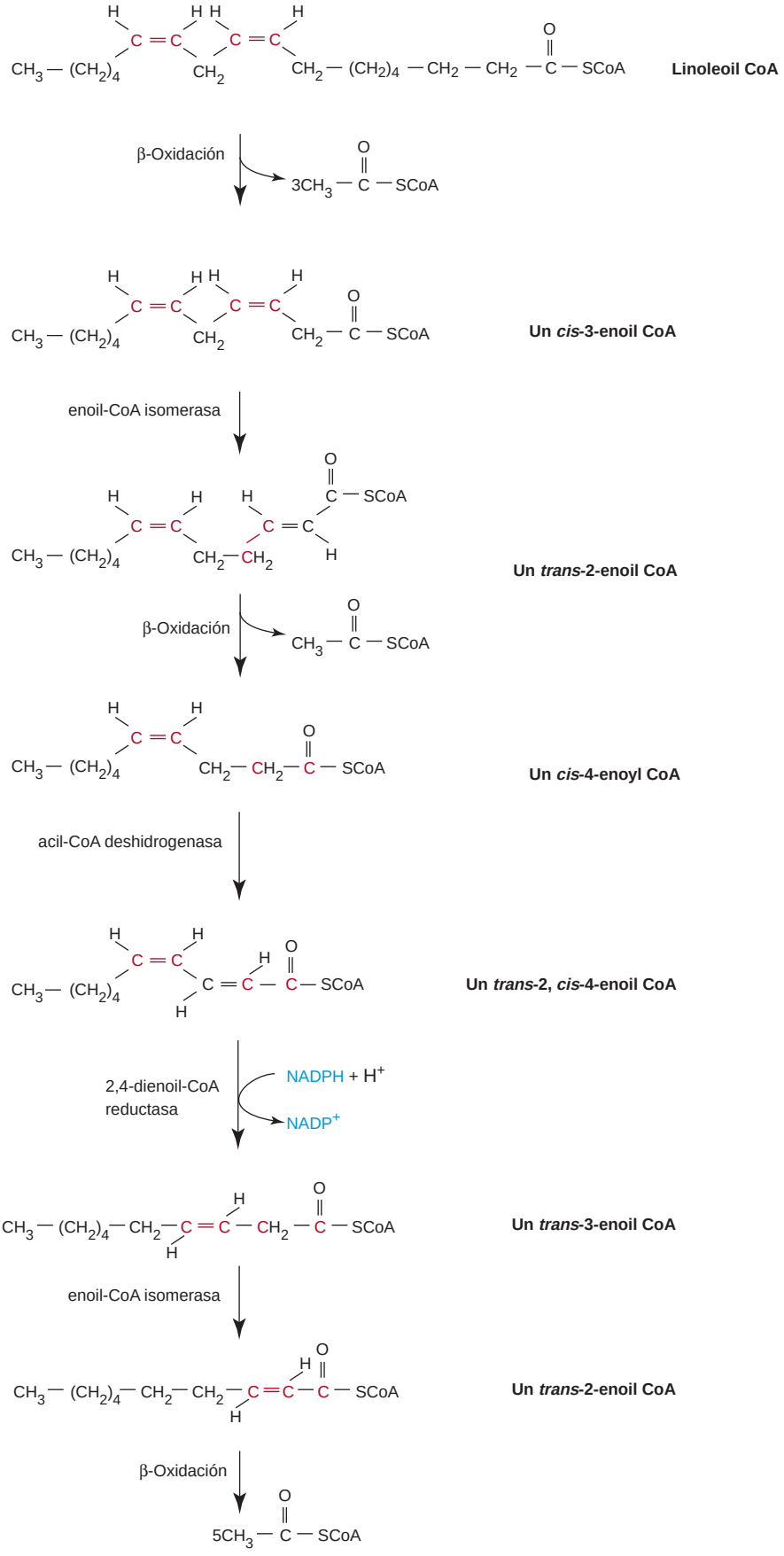
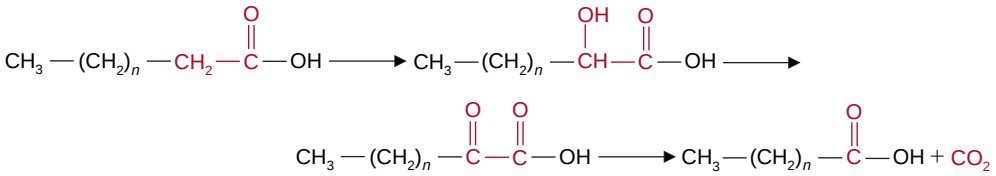


FIGURA 16.22
Oxidación del linoleil CoA.

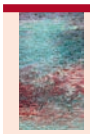
hidroxilación de ácidos de cadena larga necesarios para la síntesis de los esfingolípidos. Existen además sistemas en otros tejidos que hidroxilan el carbono α de ácidos de cadena más corta con el fin de iniciar su oxidación. La secuencia es la siguiente:



Algunas de estas hidroxilaciones tienen lugar en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias, e implican el tipo de mecanismo de "oxidasa de función mixta" ya que requieren oxígeno molecular, nucleótidos de nicotinamida reducidos y citocromos específicos. Otro sitio para la α-hidroxilación que es especialmente importante en el metabolismo de ácidos grasos ramificados (Apli. Clín. 16.6), es el peroxisoma. Aquí el acil CoA (tal como el fitanil CoA) es modificado por una hidroxilasa en la que interviene el 2-oxoglutarato, Fe^{2+}y ascorbato con formación de 2-hidroxifitanil CoA y formil CoA, siendo este último metabolizado seguidamente a CO_2 vía ácido fórmico. El 2-hidroxiftanil CoA se metaboliza seguidamente a ácido pristánico que puede ahora someterse a β-oxidación.

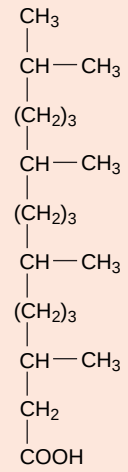
La ω-oxidación da lugar a un ácido dicarboxílico

Otra ruta minoritaria para la oxidación de ácidos grasos tiene lugar en el retículo endoplasmático de muchos tejidos. En este caso, la hidroxilación tiene lugar sobre el carbono metílico en el extremo de la molécula opuesto al grupo carboxilo, o sobre el carbono contiguo al extremo metilo. Utiliza el tipo de reacción de la "oxidasa de función mixta" y requiere citocromo P450, O_2 y NADPH, así como los enzimas necesarios (véase Capítulo 11). El ácido graso hidroxilado puede ser aún oxidado a un **ácido dicarboxílico**, a través de la acción secuencial de **alcohol** y



APLICACIÓN CLÍNICA 16.6
Enfermedad de Refsum

Aunque el uso del esquema de la α-oxidación es relativamente secundario en términos de producción total de energía, sí es significativo en el metabolismo de ácidos grasos metilados de la dieta. De entre éstos, uno de los principales es el ácido fitánico,



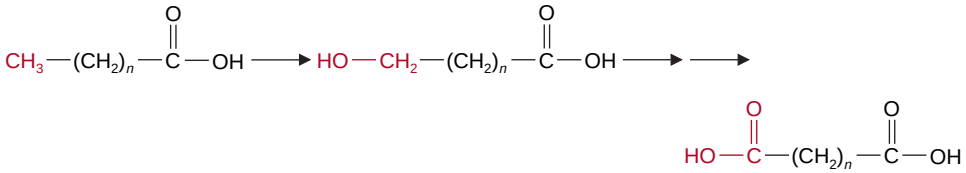
Ácido fitánico

producto metabólico del fitol, que se encuentra como constituyente de la clorofila. El ácido fitánico es un constituyente significativo de los lípidos lácteos y de las grasas animales, y se metaboliza normalmente mediante una α-hidroxilación inicial seguida de deshidrogenación y de descarboxilación. La β-oxidación no puede tener lugar en este ácido debido a la presencia del grupo 3-metilo, aunque sí puede hacerlo después de la descarboxilación. La reacción completa produce tres moléculas de propionil CoA, tres moléculas de acetil CoA y una de isobutiril CoA.

En una enfermedad genética poco común, la enfermedad de Refsum, los afectados carecen del enzima α-hidroxilante, por lo que acumulan grandes cantidades de ácido fitánico en los tejidos y en el suero. Este hecho causa problemas neurológicos graves tales como la retinitis pigmentosa, la neuropatía periférica, la ataxia cerebélica y la sordera nerviosa. La reducción en el consumo de productos lácteos y de carne de rumiante tiene como resultado la disminución del ácido fitánico del plasma, así como la regresión de los síntomas neurológicos.

Wanders, R. J. A., van Grunsven, E. G. y Jansen, G. A. Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α- and β-oxidation systems in humans. *Biochem. Soc. Trans.* 28:141, 2000.

aldehído deshidrogenasas citosólicas. Este proceso se da principalmente en ácidos grasos de longitud de cadena mediana. Las reacciones globales son



El ácido dicarboxílico formado de esta manera puede activarse en uno u otro extremo de la molécula para formar un éster del CoA, que a su vez puede experimentar una β-oxidación para producir ácidos dicarboxílicos de cadena más corta, tales como el ácido adípico (C_6) y el succínico (C_4). Este proceso también tiene lugar principalmente en los peroxisomas (véase p. 22).

Los cuerpos cetónicos se forman a partir de acetil CoA

Los cuerpos cetónicos son formas hidrosolubles de la energía basada en lípidos, y consisten en el ácido acetoacético y su producto de reducción, el ácido β-hidroxibutírico. El β-hidroxibutiril CoA y el acetoacetil CoA son intermediarios próximos al final de la secuencia de la β-oxidación, por lo que inicialmente se creyó que la eliminación enzimática del coenzima A de estos compuestos era la ruta principal para la producción de los ácidos libres. Sin embargo, la β-oxidación prosigue completamente hasta la producción de acetil CoA sin acumulación de intermediarios, y el acetoacetato y el β-hidroxibutirato se forman a continuación a partir del acetil CoA mediante un mecanismo diferente.

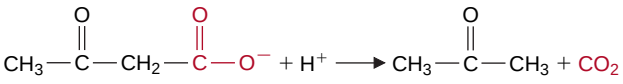
El HMG CoA es un intermediario en la síntesis de acetoacetato a partir de acetil CoA

El sitio primario de formación de cuerpos cetónicos es el hígado y, aunque con menor grado de actividad, también el riñón. El proceso tiene lugar en la matriz mitocondrial y se inicia con la condensación de dos moléculas de acetil CoA para formar acetoacetil CoA (Figura 16.23). El enzima implicado, la ***β*-cetotiolasa**, es probablemente un isozima del que cataliza la reacción inversa en el último paso de la β-oxidación. A continuación el acetoacetil CoA se condensa con otra molécula de acetil CoA, y se forma ***β*-hidroxi-*β*-metilglutaril coenzima A (HMG CoA)**. Seguidamente, la rotura del HMG CoA conduce a ácido acetoacético y acetil CoA.

El acetoacetato produce D-β-hidroxibutirato y acetona

En la mitocondria se reduce una parte del acetoacetato a D-β-hidroxibutirato, un proceso que depende de la proporción intramitocondrial de [NADH]/[NAD^+]. Obsérvese que el producto de esta reacción es el D-β-hidroxibutirato, mientras que el β-hidroxibutiril CoA que se forma durante la β-oxidación es de configuración L. La **β-hidroxibutirato deshidrogenasa** se encuentra estrechamente asociada con la membrana mitocondrial interna y, dada su elevada actividad en el hígado, las concentraciones tanto de sustratos como de productos de la reacción se mantienen cercanas al equilibrio. En consecuencia, la relación de β-hidroxibutirato a acetoacetato en la sangre que emerge del hígado puede considerarse un reflejo de la relación [NADH]/[NAD^+] mitocondrial.

Una cierta cantidad de acetoacetato se encuentra experimentando continuamente una descarboxilación lenta, no enzimática, a acetona:



En condiciones normales, la formación de acetona es insignificante, pero cuando se producen acumulaciones patológicas de acetoacetato, como por ejemplo en la cetoacidosis diabética grave (Apli. Clín. 16.7), la cantidad de acetona en la sangre puede ser suficiente para hacer que aquella sea detectable en el aliento de un paciente.

Como puede observarse en la Figura 16.24, la ruta que lleva del acetil CoA al HMG CoA también opera en el espacio citosólico de las células del hígado (de hecho, ello es aplicable a la mayoría de los tejidos del cuerpo). Sin embargo, no hay HMG-CoA liasa en el citosol, por lo que el HMG CoA formado se destina para la bio-

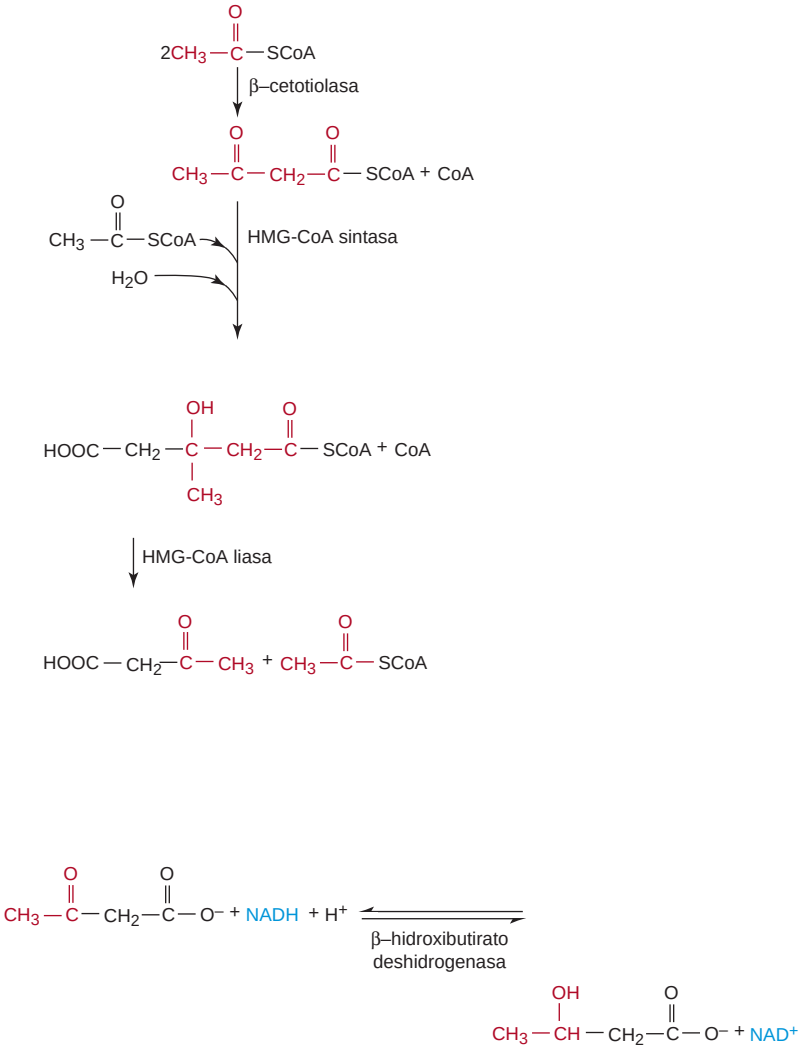
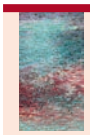


FIGURA 16.23
Ruta de formación de acetoacetato.



APLICACIÓN CLÍNICA 16.7
Cetoacidosis diabética

La cetoacidosis diabética (DKA) es una enfermedad común entre los pacientes afectados por la diabetes mellitus dependiente de insulina. Aunque su tasa de mortalidad ha disminuido, todavía oscila entre el 6 y el 10%. Esta enfermedad se debe a una deficiencia grave de insulina, junto con un exceso de glucagón, y viene acompañada frecuentemente por el aumento concomitante de otras hormonas relacionadas con el estrés, tales como la adrenalina, noradrenalina, cortisol y hormona del crecimiento. Los principales desarreglos metabólicos son una marcada hiperglucemia, una cetonemia excesiva y cetonuria. No es extraño que se llegue a unos niveles sanguíneos de los ácidos acetoacético más β-hidroxibutírico de 20 mM. Dado que ambos son ácidos relativamente fuertes (pK $\sim$ 3,5), esta situación provoca una peligrosa acidosis metabólica.

La acumulación masiva de cuerpos cetónicos en la sangre en la DKA proviene de su elevada tasa de producción hepática, por lo que se ve superada la capacidad de otros tejidos para utilizarlos. En términos bioquímicos, los acontecimientos que provocan esta situación son los mismos que inducen al desarrollo de la cetosis por inanición: es decir, relación glucagón/insulina alta $\rightarrow$ elevación del cAMP hepático $\rightarrow$ disminución de malonil CoA $\rightarrow$ desinhibición de CPT I $\rightarrow$ activación de la oxidación de ácidos grasos y de la producción de cuerpos cetónicos (en el texto se exponen los detalles). Sin embargo, y al contrario que en la cetosis fisiológica, en la cual la secreción de insulina por las células β del páncreas limita la disponibilidad de ácidos grasos libres (AGL) para el hígado, este mecanismo de restricción está ausente en los individuos diabéticos. Como consecuencia de ello, la concentración de AGL en el plasma puede llegar a niveles tan elevados como 3–4 mM, lo cual impulsa la producción hepática de cuerpos cetónicos a la máxima velocidad.

La corrección de la DKA precisa un tratamiento rápido que depende de la gravedad de las anomalías metabólicas y del equilibrio hídrico y de electrolitos en los tejidos. La insulina es esencial. Disminuye los niveles plasmáticos de glucagón, se opone a los efectos catabólicos del glucagón en el hígado, inhibe el flujo de sustratos cetogénicos y gluconeogénicos (AGL y aminoácidos) provenientes de la periferia, y estimula la captación de glucosa en los tejidos diana.

Foster, D. W. y McGarry, J. D. Metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N. Engl. J. Med.* 309:159, 1983; y Foster, D. W. y McGarry, J. D. Acute complications of diabetes: ketoacidosis, hyperosmolar coma, lactic acidosis. En: L. J. DeGroot (Ed.), *Endocrinology,* Vol. 2, 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1995, p. 1506.

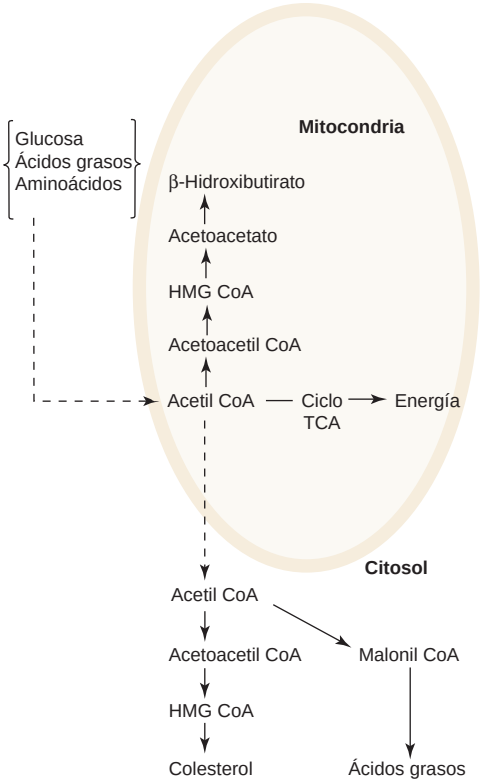


FIGURA 16.24
Interrelaciones de los cuerpos cetónicos con el metabolismo lipídico, glucídico y de los aminoácidos en el hígado.

síntesis de colesterol (véase Capítulo 17, p. 743). Lo que diferencia al hígado del resto de los demás tejidos es la elevada cantidad de **HMG-CoA sintasa** intramitocondrial, razón por la cual éste es el principal órgano productor de cuerpos cetónicos.

La utilización de los cuerpos cetónicos por tejidos no hepáticos precisa la formación de acetoacetil CoA

El acetoacetato y el β-hidroxibutirato producidos por el hígado constituyen un excelente combustible para otros tejidos, tales como el músculo cardíaco y el esquelético, en particular cuando el aporte de glucosa es limitado (inanición) o su utilización ineficiente (deficiencia de insulina). En estas condiciones, esos mismos tejidos pueden utilizar fácilmente ácidos grasos libres, cuya concentración en la sangre aumenta cuando los niveles de insulina caen, como fuente de energía. Durante muchos años la razón por la que el hígado produce cuerpos cetónicos fue una pregunta sin respuesta. Ésta apareció al final de la década de 1960, al descubrirse que en el hombre, durante el ayuno prolongado, los cuerpos cetónicos reemplazan a la glucosa como principal fuente de energía en el sistema nervioso central. También es digno de mención el hecho de que durante el período de desarrollo neonatal, el acetoacetato y el β-hidroxibutirato actúan como importantes precursores de la síntesis cerebral de lípidos.

La utilización de cuerpos cetónicos implica, en primer lugar, la reactivación del acetoacetato a su derivado del CoA. Esto se consigue por la acción de un enzima mitocondrial, la acetoacetato: succinil-CoA CoA transferasa, presente en la mayoría de los tejidos extrahepáticos, pero inexistente en el hígado. El succinil CoA sirve como fuente del coenzima. En la Figura 16.25 se presenta esta reacción. El acetoacetil CoA se convierte a continuación, por acción de la β-cetotiolasa, en acetil CoA, que se introduce a su vez en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, con producción de energía. La β-hidroxibutirato deshidrogenasa mitocondrial de tejidos extrahepáticos reconvierte el β-hidroxibutirato en acetoacetato a medida que disminuye la concentración de este último.

Durante la inanición y en ciertas condiciones patológicas se produce cetosis

Cuando la alimentación es normal, la producción hepática de acetoacetato y β-hidroxibutirato es mínima, de tal forma que la concentración sanguínea de estos compuestos es muy baja ($\leq$ 0,2 mM). Sin embargo, la falta de alimentación acelera en gran medida la síntesis de cuerpos cetónicos, hasta el extremo de que los niveles de acetoacetato y β-hidroxibutirato circulantes pueden llegar a ser del orden de 3 a 5 mM. Esta es una respuesta normal del organismo a la escasez de glúcidos. En las primeras fases del ayuno, la utilización de los cuerpos cetónicos por parte del músculo cardíaco y esquelético reserva la glucosa para el mantenimiento del sistema nervioso central y de los eritrocitos. Cuando el ayuno se prolonga, la concentración de acetoacetato y β-hidroxibutirato en la sangre aumenta, para asegurar una captación eficiente de ambas por parte del cerebro, permitiendo así un ahorro adicional de glucosa.

Determinadas condiciones patológicas, muy en especial la **cetoacidosis diabética** (Apli. Clín. 16.7), se caracterizan por una acumulación excesiva de cuerpos cetónicos en sangre (hasta 20 mM), lo cual las diferencia de la **cetosis fisiológica por inanición**. Los factores hormonales y bioquímicos que intervienen en el control global de la producción hepática de cuerpos cetónicos se tratan con detalle en el Capítulo 20.

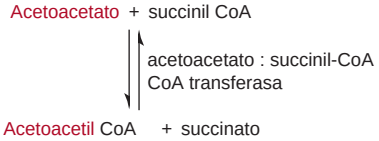


FIGURA 16.25
Paso inicial de la utilización del acetoacetato en los tejidos no hepáticos.

La oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas tiene varias funciones

Aunque la mayor parte de la oxidación de los ácidos grasos tiene lugar en la mitocondria, una fracción significativa de la oxidación de los ácidos grasos también tiene lugar en los **peroxisomas** del hígado, riñón y otros tejidos. Los peroxisomas son una clase de orgánulos subcelulares con características morfológicas y químicas propias (véase p. 22). Los peroxisomas del hígado oxidan ácidos grasos y contienen los enzimas necesarios para el proceso de la β-oxidación. El esquema de la **oxidación peroxisómica de los ácidos grasos** en los mamíferos es similar al que tiene lugar en los glioxisomas vegetales pero se diferencia del sistema de β-oxidación mitocondrial en tres aspectos importantes: en primer lugar, la deshidrogenación inicial se realiza por un sistema de oxidasa insensible al cianuro, como se muestra en la Figura 16.26. El H_2O_2 formado se elimina por la **catalasa**. Los pasos siguientes son idénticos a los

del sistema mitocondrial. En segundo lugar, existen pruebas de que los enzimas peroxisómico y mitocondrial son ligeramente diferentes, y que la especificidad en los peroxisomas es para cadenas algo más largas. En tercer lugar, aunque las mitocondrias del hígado de rata oxidan una molécula de palmitil CoA a ocho de acetil CoA, el sistema de β-oxidación de los peroxisomas de este mismo órgano es incapaz de pasar más allá del octanil CoA (C8). Así pues, una posible función de los peroxisomas sería la de acortar las cadenas de ácidos grasos relativamente largos hasta un punto en que la mitocondria pudiese completar su β-oxidación. Es interesante notar que diversos medicamentos utilizados clínicamente para disminuir los niveles de triacilgliceroles en pacientes provocan un notable incremento de peroxisomas.

Otras reacciones peroxisómicas incluyen el acortamiento de las cadenas de ácidos dicarboxílicos, la conversión del colesterol en ácidos biliares y la formación de lípidos que contienen un enlace éter. Ante funciones metabólicas tan diversas, no es de extrañar que la ausencia congénita de peroxisomas funcionales, un defecto hereditario que se conoce con el nombre de síndrome de Zellweger, tenga unos efectos tan devastadores (véase Apli. Clín. 1.5).

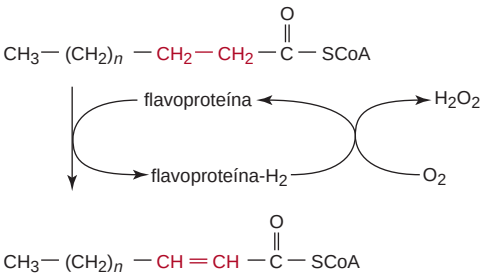


FIGURA 16.26
Paso inicial de la oxidación peroxisómica de ácidos grasos.

BIBLIOGRAFÍA

Bonnefont, J. P., Demaugre, F., Prip-Buus, C., Saudubray, J. M., Brivet, M., Abadi, N. y Thuillier, L. Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol. Gen. Metab.* 68:424, 1999.

Foster, D. W. y McGarry, J. D. Acute complications of diabetes: ketogenesis, hyperosmolar coma, lactic acidosis. En: L. J. DeGroot (Ed.), *Endocrinology,* Vol. 2, 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1995, p. 1506.

Goldstein, J. L., Hobbs, H. H. y Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* Vol. II, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 1981.

Gurr, M. I. y James, A. T. *Lipid Biochemistry, An Introduction,* 3rd ed. London: Chapman and Hall, 1980.

Hashimoto, T. Peroxisomal β-oxidation enzymes. *Neurochem. Res.* 24:551, 1999.

Kane, J. P. y Havel, R. J. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* Vol. II, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 1853.

McGarry, J. D. y Foster, D. W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu. Rev. Biochem.* 49:395, 1980.

McGarry, J. D. y Brown, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244:1, 1997.

Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A. S. y Schotz, M. C. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 49:667, 1980.

Robinson, A. M. y Williamson, D. H. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* 60:143, 1980.

Ruderman, N. B., Saha, A. K., Vavvas, D. y Witters, L. A. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 276:E1, 1999.

Stanley, C. A. Plasma and mitochondrial membrane carnitine transport defects. En: P. M. Coates y K. Tanaka (Eds.), *New Developments in Fatty Acid Oxidation.* New York: Wiley-Liss, 1992, p. 289.

Wakil, S. J., Stoops, J. K. y Joshi, V. C. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 52:537, 1983.

Wanders, R. J. A., Vreken, P., Den Boer, M. E. J., Wijburg, F. A., Van Gennip, A. H. y Ijist, L. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA β-oxidation. *J. Inher. Metab. Dis.* 22:442, 1999.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

1. Los triacilgliceroles:
   A. se supone que son buenos agentes emulsionantes.
   B producen aproximadamente la misma cantidad de ATP que produciría un peso equivalente de glucógeno cuando se oxidan completamente.
   C. se almacenan como moléculas hidratadas.
   D. en un individuo medio, representan energía suficiente para el sustento vital durante varias semanas.
   E. son en general moléculas cargadas negativamente a pH fisiológico.

2. En el hombre, los ácidos grasos:
   A. pueden sintetizarse a partir del exceso de glúcidos o proteínas de la dieta.
   B. no son necesarios en absoluto en la dieta.
   C. si contienen dobles enlaces, no pueden ser sintetizados.
   D. deben ser aportados enteramente en la dieta.
   E. a excepción del palmitato, deben ser suministrados en la dieta.

3. Las siguientes afirmaciones sobre la acetil-CoA carboxilasa son ciertas, EXCEPTO:
   A. sufre una interconversión protómero–polímero durante su regulación fisiológica.
   B. requiere biotina.
   C. es inhibida por una fosforilación mediada por cAMP.
   D. es activada tanto por el palmitil CoA como por el citrato.
   E. su contenido en una célula responde a cambios en el contenido de grasa en la dieta.

4. En la síntesis del palmitato en las células hepáticas:
   A. la adición de malonil CoA a la ácido graso sintasa alarga la cadena creciente en tres carbonos.
   B. un residuo β-ceto de la porción 4′-fosfopanteteína se reduce para dar el residuo saturado, por acción del NADPH.
   C. se libera palmitil CoA de la sintasa.
   D. después de la adición del siguiente malonil CoA, la cadena en crecimiento debe transferirse desde la ACP a otro — SH.

E. el primer compuesto que se adiciona a la ácido graso sintasa es el malonil CoA.

5. El citrato estimula la síntesis de ácidos grasos de todas las formas siguientes, EXCEPTO:
   A. activando alostéricamente la acetil-CoA carboxilasa.
   B. proporcionando un mecanismo para transportar el acetil CoA desde la mitocondria al citosol.
   C. participando en una ruta que en último término produce CO_2 y NADPH en el citosol.
   D. participando en la producción de ATP.

6. La ácido graso sintasa:
   A. sólo sintetiza palmitato.
   B. cuando pasa por alto un paso reductor, produce ácidos grasos insaturados.
   C. produce hidroxiácidos grasos en el tejido nervioso.
   D. puede detenerse liberando un alcohol graso, en vez de un ácido.
   E. puede producir un ácido graso ramificado si utiliza metilmalonil CoA como sustrato.

7. En el hombre, la desaturación de los ácidos grasos:
   A. tiene lugar mayoritariamente en las mitocondrias.
   B. es catalizada por un sistema enzimático que utiliza NADPH y un citocromo.
   C. introduce dobles enlaces principalmente con configuración trans.
   D. puede llevarse a cabo solamente después de que el palmitato haya sido elongado a ácido esteárico.
   E. introduce el primer doble enlace en el extremo metilo de la molécula.

8. Los acontecimientos siguientes están todos implicados en la síntesis de triacilgliceroles en el tejido adiposo, EXCEPTO:
   A. la adición de un acil CoA graso a un diacilglicerol.
   B. la adición de un acil CoA graso a un lisofosfátido.
   C. una reacción catalizada por la glicerol quinasa.
   D. la hidrólisis de ácido fosfatídico por acción de una fosfatasa.
   E. la reducción de la dihidroxiacetona fosfato.

9. Las lipoproteínas plasmáticas:
   A. son los únicos transportadores sanguíneos de la energía contenida en los lípidos.
   B. tienen habitualmente un núcleo apolar formado por triacilgliceroles y ésteres de colesterol.
   C. están compuestos principalmente de ácidos grasos libres (no esterificados).
   D. incluyen los quilomicrones generados en el hígado.
   E. incluyen las lipoproteínas de alta densidad (HDL) como el principal transportador de la energía contenida en los lípidos.

10. La lipoproteína lipasa:
    A. es un enzima intracelular.
    B. es estimulada por fosforilación mediada por cAMP.
    C. actúa movilizando los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo.
    D. es estimulada por una de las apoproteínas presentes en la VLDL.
    E. hidroliza fácilmente los tres ácidos grasos de un triacilglicerol.

11. La alta proporción glucagón: insulina que se observa en el ayuno prolongado:
    A. induce la movilización de ácidos grasos de las reservas adiposas.
    B. estimula la β-oxidación al inhibir la producción de malonil CoA.
    C. conduce a un incremento en la concentración de cuerpos cetónicos en la sangre.
    D. todo lo anterior.
    E. nada de lo anterior.

Preguntas 12 y 13: Después de un fuerte resfriado que produjo una pérdida de apetito, un niño de un año fue hospitalizado con hipoglucemia, hiperamonemia, debilidad muscular e irregularidades cardíacas. Estos efectos eran consistentes con un defecto en el sistema de transporte de carnitina. Se probó sin éxito una terapia con carnitina en la dieta pero, en cambio una dieta con pocos ácidos grasos de cadena larga y suplementada con triacilgliceroles de cadena media fue beneficiosa.

12. Una deficiencia de carnitina, sería de esperar que interfiriese en:
    A. la β-oxidación.
    B. la formación de cuerpos cetónicos a partir de acetil CoA.
    C. la síntesis de palmitato.
    D. la movilización de los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo.
    E. la captación celular de los ácidos grasos de la sangre.

13. Al niño se le diagnosticó una deficiencia de carnitina-acilcarnitina translocasa. El tratamiento con la dieta fue beneficioso porque:
    A. el niño podía obtener toda la energía requerida a partir de glúcidos.
    B. la deficiencia estaba en el sistema de oxidación peroxisómica por lo que no intervenía la carnitina.
    C. los ácidos grasos de cadena media (8-10 carbonos) entran en la mitocondria antes de ser convertidos en sus derivados CoA.
    D. los triacilgliceroles de cadena media contienen mayoritariamente ácidos grasos hidroxilados.
    E. los ácidos grasos de cadena media tales como C_8 y C_{10} se convierten fácilmente en glucosa en el hígado.

Preguntas 14 y 15: La deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), un defecto en la β-oxidación, normalmente produce síntomas dentro de los dos primeros años de vida después de un período de ayuno. Entre los síntomas típicos se cuentan vómitos, letargia e hipoglucemia hipocetótica. La excreción urinaria en exceso de ácidos dicarboxílicos de cadena media y de ésteres de glicina y carnitina de cadena media ayudan a establecer el diagnóstico.

14. La β-oxidación de los ácidos grasos:
    A. tiene la capacidad de generar ATP solamente si el acetil CoA se oxida a continuación.
    B. normalmente queda suprimida durante la inanición.
    C. utiliza únicamente como sustratos ácidos grasos saturados y de cadena par.
    D. utiliza $NADP^+$.
    E. tiene lugar por una secuencia repetida de cuatro reacciones.

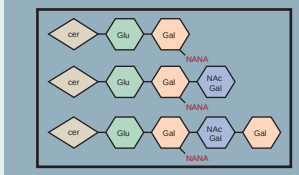
15. La falta de cuerpos cetónicos en presencia de una baja glucosa sanguínea en este caso es rara ya que las concentraciones de cuerpos cetónicos aumentan con la hipoglucemia inducida por el ayuno. Los cuerpos cetónicos:
    A. se forman por eliminación del coenzima A del correspondiente intermediario de la β-oxidación.
    B. se sintetizan a partir del β-hidroxi-β-metil glutaril CoA (HMG CoA) citoplasmático.
    C. se sintetizan mayoritariamente en el tejido muscular.
    D. son el β-hidroxibutirato y el acetoacetato, cuya relación es un reflejo de la relación $[NADH]/[NAD^+]$ hepática.
    E. se forman cuando se interrumpe la β-oxidación.

Problemas

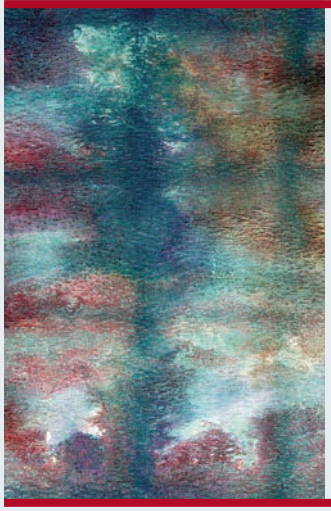
16. ¿Cuál es la síntesis neta máxima aproximada de enlaces fosfato de alta energía (~P) asociados al ATP en la oxidación completa de 1 mol de ácido oleico en una célula muscular?
17. ¿De qué modo la oxidación de un ácido graso de 17 carbonos (de plantas) conduce a la producción de propionil CoA? Sea específico en su respuesta.

RESPUESTAS

1. **D** A, C y E: Los triacilgliceroles son moléculas neutras, hidrofóbicas, sin ninguna porción hidrofílica, y, por lo tanto, no son agentes emulsionantes y se almacenan en estado anhidro. B: Debido a que están más reducidos que los glúcidos son más ricos en energía.
2. **A** Es importante darse cuenta de que los triacilgliceroles son la forma última de almacenamiento de los excedentes alimenticios de la dieta. B–E: Somos capaces de sintetizar la mayoría de los ácidos grasos, incluidos los que poseen dobles enlaces, a excepción de los ácidos grasos esenciales, el linoleico y el linolénico.
3. **D** A: La acetil-CoA carboxilasa alterna entre sus formas protomérica (inactiva) y polimérica (activa) por la influencia de multitud de factores reguladores. C: Puesto que el cAMP se incrementa en aquellas ocasiones en que se necesita energía, ello es coherente con que un proceso que requiera energía sea inhibido. E: El control a largo plazo está relacionado con la síntesis de enzimas y responde adecuadamente a los cambios dietéticos.
4. **B** A: La escisión de CO_2 a partir del malonil CoA es el factor impulsor de la reacción de condensación, de tal forma que la cadena crece de dos en dos carbonos. C: En los mamíferos el palmitato se libera como ácido libre; la conversión a éster de CoA la realiza un enzima diferente. D: Debe resaltarse que sólo la ACP se une al malonil CoA entrante por lo que debe ser liberada antes de que pueda realizarse otra adición. E: Se adiciona primero acetil CoA, formando los cimientos para el resto de la cadena.
5. **D** El citrato consume ATP cuando actúa como sustrato del enzima de rotura del citrato. A: Tabla 16.2. B: El acetil CoA se genera fundamentalmente en la mitocondria pero no puede cruzar la membrana fácilmente. C: El oxalacetato generado por rotura enzimática del citrato, cuando se convierte en piruvato, produce CO_2 y NADPH por acción del enzima málico.
6. **E** Aunque este proceso es mucho más lento que la reacción con malonil CoA, es sin embargo significativo. A: En algunos tejidos, como por ejemplo en las glándulas mamarias, se forman productos de cadena más corta. B–D: Todos estos productos se forman por otros procesos. Las reacciones que tienen lugar en complejos multienzimáticos no suelen "detenerse" en pasos intermedios.
7. **B** A: La desaturación tiene lugar en el retículo endoplasmático. C: Los ácidos grasos naturales son cis. D: La elongación y la insaturación pueden tener lugar en cualquier orden. E: Si esto fuera verdad, podríamos fabricar ácido linoleico.
8. **C** Esto no ocurre de forma significativa en el tejido adiposo. A, B y D: La adición secuencial de acil CoA grasos al glicerol 3-fosfato da lugar a ácido lisofosfatídico, y a continuación a ácido fosfatídico, cuyo fosfato se pierde antes de la adición del tercer residuo de acil graso. E: Ésta es la formación de α-glicerol fosfato en el tejido adiposo.
9. **B** Todas las lipoproteínas tienen esta misma estructura general, un núcleo apolar rodeado por una capa más polar. A y C: Otras fuentes son los ácidos grasos unidos a la seroalbúmina y los cuerpos cetónicos. D: Los quilomicrones transportan los lípidos de la dieta desde el intestino. E: La función de la HDL es llevarse el colesterol de los tejidos.
10. **D** A–C: Estas son propiedades de las lipasas sensibles a hormonas. E: Por lo general, se necesita más de una lipasa para hidrolizar todos los ácidos grasos.
11. **D** Una relación glucagón/insulina elevada provoca una serie de fosforilaciones mediadas por cAMP, que activan las lipasas sensibles a hormonas e inhiben la acetil-CoA carboxilasa en el hígado lo que conduce a la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo y a un descenso de malonil CoA en el hígado. El descenso en malonil CoA da lugar a la desrepresión de la actividad CPT I lo que permite la producción acelerada de acetil CoA en la mitocondria y, en último término, de cuerpos cetónicos, a partir de los ácidos grasos movilizados.
12. **A** La carnitina actúa en el transporte hacia la mitocondria de los ésteres de acil CoA graso formados en el citosol. B: El acetil CoA para los cuerpos cetónicos proviene de fuentes diferentes además de los ácidos grasos. C: La síntesis de ácidos grasos es un proceso citosólico. D: La movilización está bajo control hormonal. E: Los ácidos grasos atraviesan la membrana plasmática.
13. **C** Dado que los ácidos grasos de cadena media atraviesan directamente la membrana mitocondrial no requieren el sistema de la carnitina. A: Esto no es nunca cierto. B: La oxidación peroxisómica no requiere carnitina pero esto no es un sistema peroxisómico. D: Los ácidos grasos hidroxilados no son un constituyente habitual de los triacilgliceroles. E: El hígado no puede sintetizar glucosa a partir de ácidos grasos con un número par de átomos de carbono.
14. **E** A y D: Debe resaltarse que la β-oxidación por sí misma genera $FADH_2$ y NADH, los cuales se pueden reoxidar para formar ATP. B: La oxidación de ácidos grasos está favorecida normalmente durante el ayuno. C: La β-oxidación es un proceso general que, con pequeñas modificaciones, oxida prácticamente a cualquier ácido graso de las células.
15. **D** A y E: La β-oxidación transcurre hasta el final; los cuerpos cetónicos se forman en un proceso diferente. B y C: Los cuerpos cetónicos se forman, pero no se utilizan, en las mitocondrias del hígado; el HMG CoA citosólico es un precursor del colesterol. Los cuerpos cetónicos no se sintetizan fácilmente en el músculo.
16. El ácido oleico tiene 18 carbonos y un doble enlace. Nueve acetil CoA × 10 = 90 ATP. Siete flavoproteínas reducidas × 1,5 = 10,5 ATP (*Nota:* En un paso no es necesaria la reducción de la flavoproteína debido a que no está presente el doble enlace. La isomerasa que convierte el enlace *cis*-3-enoilo en enlace *trans*-2-enoilo no requiere ATP). 8 NADH × 2,5 = 20 ATP. Total 120,5 ATP − 2 ~ P (para la activación) = 118,5 ~ P/ácido oleico.
17. La β-oxidación transcurre normalmente pero la rotura final por la tiolasa da acetil CoA y propionil CoA. El propionil CoA *no* es sustrato de la SCAD (acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta) por lo que finaliza la β-oxidación.



17



METABOLISMO LIPÍDICO II: RUTAS METABÓLICAS DE LÍPIDOS ESPECIALES

Robert H. Glew

17.1 VISIÓN GENERAL 728

17.2 FOSFOLÍPIDOS 728

Los fosfolípidos contienen 1,2-diacilglicerol y una base unida mediante un enlace fosfodiéster 729
Los fosfolípidos de las membranas realizan diversas funciones 730
- La dipalmitil-lecitina es necesaria para que la función pulmonar sea normal 730
- Los inosítidos intervienen en las transducción de señales 732
- El fosfatidilinositol sirve para anclar glucoproteínas a la membrana plasmática 733

Biosíntesis de fosfolípidos 734
- El ácido fosfatídico se sintetiza a partir de α-glicerol fosfato y acil CoA graso 734
- Fosfolípidos específicos se sintetizan mediante adición de una base al ácido fosfatídico 736

La distribución asimétrica de ácidos grasos en los fosfolípidos se debe a reacciones de remodelado 738
- Los plasmalógenos se sintetizan a partir de alcoholes grasos 740

17.3 COLESTEROL 741

El colesterol, compuesto alicíclico, está ampliamente distribuido tanto en forma libre como esterificada 741
El colesterol es un componente de la membrana y es el precursor de las sales biliares y de las hormonas esteroides 741
El colesterol se sintetiza a partir del acetil CoA 742
- El ácido mevalónico es un intermediario clave 742
- El ácido mevalónico es un precursor del farnesil pirofosfato 744
- El colesterol se forma a partir del farnesil pirofosfato vía escualeno 745

Lipoproteínas plasmáticas 745
La biosíntesis del colesterol está finamente regulada 750
El colesterol se excreta principalmente en forma de ácidos biliares 752
La vitamina D se sintetiza a partir de un intermediario de la ruta biosintética del colesterol 753

17.4 ESFINGOLÍPIDOS 754

Biosíntesis de la esfingosina 754
Las ceramidas son derivados amídicos de ácidos grasos que provienen de la esfingosina 755
La esfingomielina es el único esfingolípido que contiene fósforo 756
- La esfingomielina se sintetiza a partir de una ceramida y de fosfatidilcolina 756

Los glucoesfingolípidos contienen normalmente una unidad de galactosa o de glucosa 756
- Los cerebrósidos son glucosilceramidas 758
- Un sulfátido es un éster del ácido sulfúrico y galactocerebrósido 759
- Los globósidos son oligosacáridos de ceramida 759
- Los gangliósidos contienen ácido siálico 760

Las esfingolipidosis son enfermedades de almacenamiento lisosómico con defectos en la ruta catabólica de los esfingolípidos 762
- Ensayos enzimáticos para el diagnóstico de esfingolipidosis 764

17.5 PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS 766

Las prostaglandinas y los tromboxanos son derivados de ácidos monocarboxílicos de veinte carbonos 766
En la síntesis de las prostaglandinas interviene la ciclooxigenasa 767
- La producción de prostaglandinas es inhibida por agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides 769

Las prostaglandinas producen numerosos efectos fisiológicos 770

17.6 LIPOXIGENASA Y ÁCIDOS OXI-ICOSATETRAENOICOS 770
Los ácidos monohidroperoxi-icosatetraenoicos son productos de la acción de la lipoxigenasa 771
Los leucotrienos y los ácidos hidroxi-icosatetraenoicos son hormonas derivadas de los HPETE 772
Los leucotrienos y los HETE afectan a varios procesos fisiológicos 773
BIBLIOGRAFÍA 774
PREGUNTAS 775
RESPUESTAS 777
APLICACIONES CLÍNICAS
17.1 Síndrome del dolor respiratorio 731
17.2 Tratamiento de la hipercolesterolemia 751
17.3 Aterosclerosis 752
17.4 Diagnóstico de la enfermedad de Gaucher en un adulto 765

17.1 VISIÓN GENERAL

Lípido es un término general que describe sustancias relativamente insolubles en agua y extraíbles mediante disolventes no polares. Los lípidos complejos del cuerpo humano se dividen en dos grandes categorías: los lípidos apolares, tales como los triacilgliceroles y los ésteres de colesterol, y los lípidos polares, que son anfipáticos al contener tanto un dominio hidrofóbico como una región hidrofílica en la misma molécula. En este capítulo se tratarán los lípidos polares, que incluyen los fosfolípidos, los esfingolípidos y los icosanoides. Los dominios hidrofílico e hidrofóbico están unidos por una porción de glicerol en los glicerofosfolípidos, y por una esfingosina en el caso de la esfingomielina y de los glucoesfingolípidos. En lo concerniente a su localización, los triacilgliceroles están situados mayoritariamente en puntos de almacenamiento en el tejido adiposo, mientras que los lípidos polares se encuentran principalmente en las membranas celulares. Los aceites de soja, palma, semilla de colza, girasol, semilla de algodón y cacahuete representan el 80% de la producción mundial de aceite vegetal, y consisten principalmente en ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. Las membranas contienen, generalmente, alrededor del 40% de su peso seco en forma de lípido, y el 60% restante en forma de proteína.

Los procesos de reconocimiento intercelular, fagocitosis, inhibición por contacto y rechazo de órganos y tejidos transplantados son fenómenos de importancia médica en los que intervienen sitios de reconocimiento altamente específicos, situados sobre la superficie de la membrana plasmática. Se describirá en este capítulo la síntesis de glucoesfingolípidos complejos, que desempeñan aparentemente un papel en estos importantes acontecimientos biológicos. Los glucolípidos son dignos de estudio, ya que los determinantes antigénicos ABO de los grupos sanguíneos son principalmente de naturaleza glucolipídica. Además, las sustancias de almacenamiento que se acumulan en el hígado, bazo, riñón o tejido nervioso de las personas que sufren ciertas enfermedades genéticas denominadas esfingolipidosis, son diversos esfingolípidos. Para poder entender las bases de estos estados de deficiencia enzimática, es necesario un conocimiento previo de las estructuras químicas pertinentes que están implicadas en los mismos.

Un lípido muy importante es el colesterol. En este capítulo se describe la ruta biosintética del colesterol y su regulación, y se muestra también cómo el colesterol actúa como precursor de las sales biliares y de las hormonas esteroideas. También se describe el papel de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y de la lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT) en el tratamiento del colesterol plasmático.

Por último, este capítulo describe el metabolismo y la función de dos tipos de hormonas de gran importancia farmacológica derivadas del ácido araquidónico, denominadas prostaglandinas y leucotrienos. En el Apéndice (p. 1175) se expone la nomenclatura y química de los lípidos.

17.2 FOSFOLÍPIDOS

Las dos clases principales de **acilglicerolípidos** son los **triacilgliceroles** y los **glicerofosfolípidos**. Se les conoce como glicerolípidos, ya que el núcleo de estos compuestos es un poliol de tres carbonos, el glicerol. Los dos grupos alcohol primarios del glicerol no son idénticos desde el punto de vista estereoquímico, y, en el caso de los fosfolípidos, es normalmente el mismo grupo hidroxilo el que está esterificado con el residuo fosfato. El sistema de numeración estereoespecífica es el mejor sistema para designar los diferentes grupos hidroxilo. En este sistema, cuando se escribe la estructura del glicerol mediante la proyección de Fischer y con el grupo hidroxilo sobre el

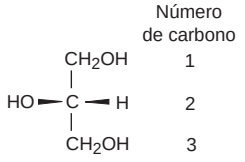


FIGURA 17.1
Numeración estereoespecífica del glicerol.

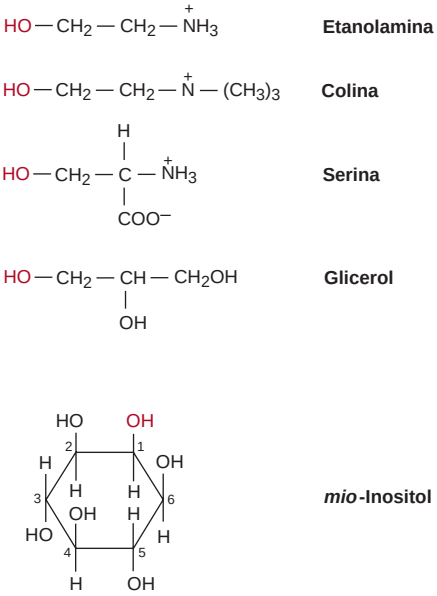


FIGURA 17.2
Estructura de algunos de algunos grupos polares comunes de los fosfolípidos.

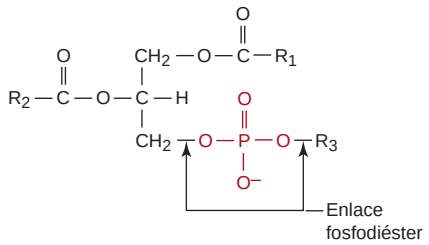


FIGURA 17.3
Estructura generalizada de un fosfolípido en donde R_1 y R_2 representan las cadenas alifáticas de ácidos grasos, y R_3 representa algún grupo polar.

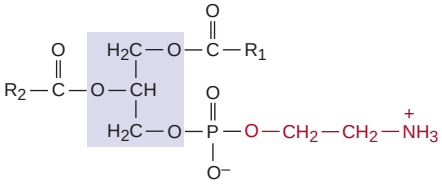
C-2 hacia la izquierda, los átomos de carbono se numeran tal como se muestra en la Figura 17.1. Cuando se utiliza el sistema de numeración estereoespecífica (*sn*), se emplea el prefijo *sn*- antes del nombre del compuesto. Los glicerofosfolípidos contienen usualmente una porción *sn*-glicerol 3-fosfato. Aunque cada uno contiene la porción glicerol como elemento estructural fundamental, los triacilgliceroles neutros y los fosfolípidos iónicos cargados tienen propiedades físicas y funciones muy diferentes.

Los fosfolípidos contienen 1,2-diacilglicerol y una base unida mediante un enlace fosfodiéster

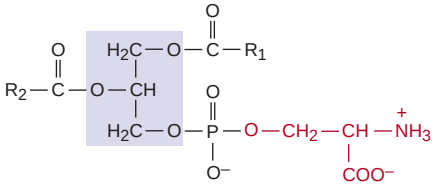
Los fosfolípidos son lípidos iónicos polares compuestos por 1,2-diacilglicerol y un enlace fosfodiéster que une el esqueleto del glicerol a alguna base, generalmente nitrogenada, tal como la colina, serina o etanolamina (Figuras 17.2 y 17.3). Los fosfolípidos más abundantes en los tejidos humanos son la **fosfatidilcolina** (también llamada lecitina), la **fosfatidiletanolamina** y la **fosfatidilserina** (Figura 17.4). A pH fisiológico, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina no tienen carga neta y adoptan la forma de zwiteriones dipolares, mientras que la fosfatidilserina tiene una carga neta de −1, por lo que es un fosfolípido ácido. La fosfatidiletanolamina (PE) está relacionada con la fosfatidilcolina, ya que la trimetilación de la PE produce lecitina. Muchos fosfolípidos contienen más de una clase de ácido graso por molécula, por lo que una clase dada de fosfolípidos de un tejido cualquiera, representa, de hecho, una familia de especies moleculares. La fosfatidilcolina (PC) contiene mayoritariamente ácido palmítico (16:0) o ácido esteárico (18:0) en la posición *sn*-1 y principalmente los ácidos grasos insaturados de 18 carbonos oleico, linoleico o linolénico en la posición *sn*- 2. La fosfatidiletanolamina tiene los mismos ácidos grasos saturados que la PC en la posición *sn*-1, pero contiene una mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, a saber 18:2, 20:4 y 22:6, en la posición *sn*-2.

El **fosfatidilinositol** es un fosfolípido ácido que se encuentra en las membranas de mamíferos (Figura 17.5). El fosfatidilinositol es algo inusual, ya que a menudo contiene casi exclusivamente ácido esteárico en la posición *sn*-1 y ácido araquidónico (20:4) en la posición *sn*-2.

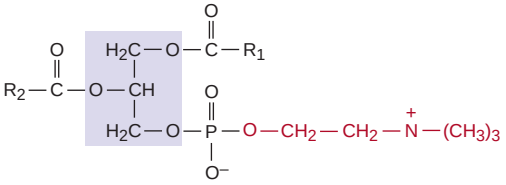
Otro fosfolípido formado por una cabeza polar tipo poliol es el **fosfatidilglicerol** (Figura 17.5) que está presente en cantidades relativamente grandes en las membranas mitocondriales y en el tensioactivo pulmonar, y es un precursor de la cardiolipina. Tanto el fosfatidilglicerol como el fosfatidilinositol son portadores de una carga formal de −1 a pH neutro y son, por tanto, lípidos ácidos. La **cardiolipina**, fosfolípido muy ácido (carga, −2), está compuesta por dos moléculas de ácido fosfatídico unidas covalentemente a través de una molécula de glicerol. La car-



Fosfatidiletanolamina

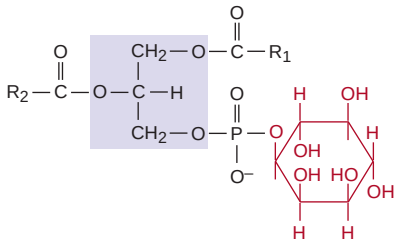


Fosfatidilserina

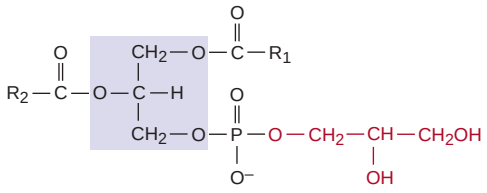


Fosfatidilcolina (lecitina)

FIGURA 17.4
Estructura de algunos fosfolípidos comunes.



Fosfatidilinositol



Fosfatidilglicerol

FIGURA 17.5
Estructuras del fosfatidilglicerol y del fosfatidilinositol.

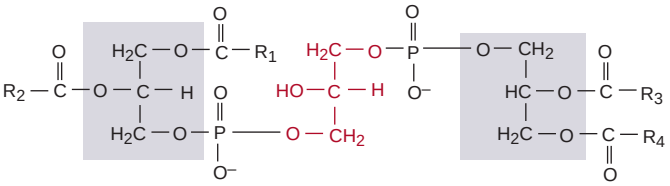


FIGURA 17.6
Estructura de la cardiolipina.

diolipina se encuentra fundamentalmente en la membrana interna de la mitocondria y en las membranas bacterianas (Figura 17.6).

Los fosfolípidos tratados hasta este momento sólo contienen residuos *O*-acilo unidos al glicerol. También pueden haber sustituyentes *O*-(1-alquenilo) en el *C*-1 de la porción *sn*-glicerol de fosfoglicéridos en combinación con un residuo *O*-acilo esterificado en la posición *C*-2; los compuestos de esta clase se denominan **plasmalógenos** (Figura 17.7). En la mielina se encuentran cantidades relativamente grandes del **plasmalógeno de etanolamina** (también denominado plasmeniletanolamina), que en cambio, se encuentra en cantidades menores en el músculo cardíaco, en donde es abundante el plasmalógeno de colina.

Un fosfolípido inusual es el denominado **factor de activación plaquetario** (PAF) (Figura 17.8), que constituye uno de los principales mediadores de la hipersensibilidad, los procesos alérgicos, las reacciones inflamatorias agudas y el shock anafiláctico. En los individuos hipersensibles, las células de la familia de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) (basófilos, neutrófilos y eosinófilos), macrófagos y monocitos están recubiertos de moléculas de IgE específicas para un determinado antígeno (p. ej., polen, veneno de abeja). La reexposición posterior al antígeno y la formación del complejo antígeno–IgE sobre la superficie de las células inflamatorias mencionadas provoca la síntesis y liberación de PAF, que contiene una porción *O*-alquilo en la posición *sn*-1 y un residuo acetilo en lugar de un ácido graso de cadena larga en la posición 2 de la porción de glicerol. El PAF no se almacena, sino que se sintetiza y libera cuando se estimulan los PMN. El PAF afecta a la agregación plaquetaria, provoca cambios cardiovasculares y pulmonares, edema, hipotensión y quimiotaxis de las células PMN.

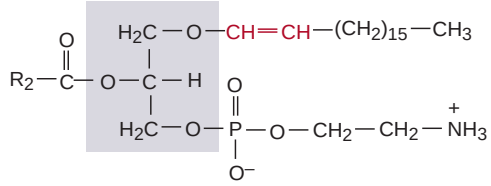


FIGURA 17.7
Estructura del plasmalógeno de etanolamina.

Los fosfolípidos de las membranas realizan diversas funciones

Aunque se hallan presentes en fluidos corporales tales como el plasma y la bilis, las concentraciones más elevadas de fosfolípidos se encuentran en las diversas membranas celulares donde actúan como componentes estructurales y funcionales. Casi la mitad de la masa de la membrana plasmática hepática está formada por diversos glicerofosfolípidos (véase p. 501). Los fosfolípidos también activan ciertos enzimas. La β-hidroxibutirato deshidrogenasa es un enzima incrustado en la membrana interna de las mitocondrias (véase p. 563) que tiene un requerimiento absoluto de fosfatidilcolina; ni la fosfatidilserina, ni la fosfatidiletanolamina pueden sustituirla.

La dipalmitil-lecitina es necesaria para que la función pulmonar sea normal

El funcionamiento normal del pulmón depende del suministro constante de **dipalmitil-lecitina**, en el que la molécula de lecitina contiene ácido palmítico (16:0), tanto en la posición *sn*-1, como en la *sn*-2. Más del 80% del fosfolípido de la capa líquida extracelular que tapiza los alveolos de los pulmones normales está constituido por dipalmitil-lecitina. Este fosfolípido especial—llamado **tensioactivo—** es producido por las células epiteliales del tipo II, e impide la atelectasia al final de la fase de expiración de la respiración (Figura 17.9). Este lípido reduce la tensión superficial de la capa acuosa del pulmón. Las moléculas de lecitina que no contienen dos residuos de ácido palmítico no son efectivas en la disminución de la tensión superficial de la capa fluida que tapiza los alveolos. El tensioactivo también contiene fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y proteínas de 18 y 36 kDa (las llamadas proteínas tensioactivas), que contribuyen significativamente a la capacidad de disminución de la tensión superficial del tensioactivo pulmonar.

Durante el tercer trimestre —antes de la vigesimoctava semana de gestación— el pulmón fetal sintetiza principalmente esfingomielina. Normalmente, en ese momento, el glucógeno que se ha almacenado en las células epiteliales del tipo II se convierte

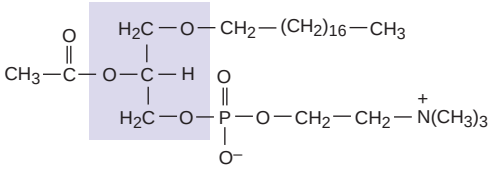


FIGURA 17.8
Estructura del factor de activación plaquetario (PAF).

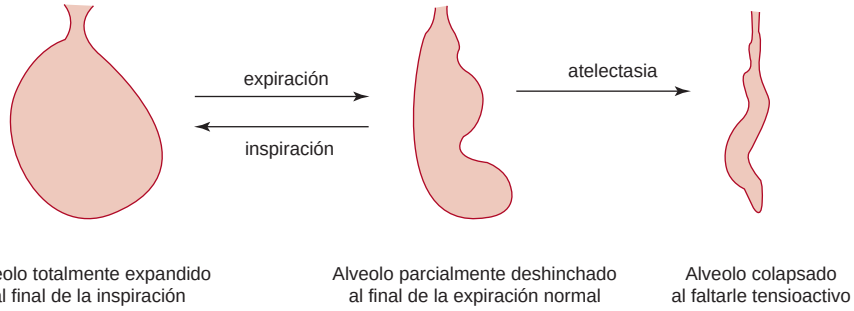
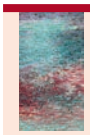


FIGURA 17.9
Papel del tensioactivo en la prevención de la atelectasia.

en ácidos grasos, y seguidamente en dipalmitil-lecitina. Durante la maduración del pulmón existe una buena correlación entre el incremento de cuerpos de inclusión lamelares, que representan los orgánulos de almacenamiento del tensioactivo pulmonar intracelular (fosfatidilcolina), denominados cuerpos lamelares, y la disminución simultánea del contenido de glucógeno de los neumocitos del tipo II. Durante la vigésimo cuarta semana de gestación, en el epitelio alveolar aparecen los neumocitos granulares del tipo II, que al cabo de pocos días producen sus típicos cuerpos de inclusión lamelares, osmiofílicos. El número de células del tipo II aumenta hasta la trigésimo segunda semana, en la que aparece el agente superficial activo en el pulmón y en el líquido amniótico. La tensión superficial disminuye cuando aumentan los cuerpos de inclusión en las células del tipo II. En las semanas anteriores al parto pueden realizarse pruebas de rastreo del líquido amniótico para detectar recién nacidos con riesgo de RDS (síndrome del dolor respiratorio) (Apli. Clín. 17.1). Estas pruebas son útiles para elegir el momento del parto, aplicar una terapia preventiva vigorosa al niño recién nacido, y para determinar si la madre ha de ser tratada con un glucocorticoide para acelerar la maduración del pulmón fetal. Asimismo, el tratamiento con dexametasona se ha utilizado también en recién nacidos con enfermedad pulmonar crónica (displasia broncopulmonar). No obstante, y a pesar de la utilidad de los corticosteroides en el tratamiento de algunos casos de enfermedades pulmonares, en otras ocasiones provocan anormalidades periventriculares en el cerebro.

En los adultos también se puede producir fallo respiratorio, debido a una insuficiencia de tensioactivo cuando se han destruido las células de tipo II o neumocitos productores de tensioactivo, todo ello como un efecto secundario adverso en el uso de medicaciones inmunosupresoras o fármacos quimioterapéuticos.



APLICACIÓN CLÍNICA 17.1
Síndrome del dolor respiratorio

El síndrome del dolor respiratorio (RDS) es una causa importante de morbilidad y de mortalidad neonatal en muchos países. Representa aproximadamente de un 15 a un 20% de todas las muertes de recién nacidos en países occidentales, y algo menos en los países en vías de desarrollo. La enfermedad afecta solamente a los niños prematuros y su incidencia varía directamente con el grado de prematuridad. Los niños prematuros desarrollan el RDS a causa de la inmadurez de sus pulmones, que se debe a una deficiencia del tensioactivo pulmonar. Se puede predecir prenatalmente la madurez del pulmón fetal midiendo la proporción lecitina/esfingomielina (L/S) en el líquido amniótico. La proporción L/S media en los embarazos normales aumenta gradualmente con la gestación hasta las 31 ó 32 semanas, en las que la pendiente aumenta bruscamente. La razón de 2,0, que es característica del bebé en el nacimiento, se consigue a la edad gestacional de unas 34 semanas. Con el fin de predecir la madurez pulmonar, la proporción L/S crítica es de 2,0 o mayor. El riesgo de tener RDS cuando la proporción L/S es de 1,5 a 1,9, es de aproximadamente el 40%, y para una proporción menor de 1,5, de alrededor del 75%. Aunque la proporción L/S en el líquido amniótico aún se utiliza ampliamente para predecir el riesgo de RDS, los resultados no son fiables si la muestra de líquido amniótico ha sido contaminada con sangre o meconio obtenidos durante una gestación complicada.

En los últimos años, se ha encontrado que la determinación de la palmitilfosfatidilcolina saturada (SPC), del fosfatidilglicerol y del fosfatidilinositol pueden utilizarse como parámetros adicionales para predecir el riesgo de padecer RDS. La terapia de sustitución por tensioactivo exógeno, que utiliza tensioactivo procedente de pulmones humanos y animales, resulta efectiva en la prevención y el tratamiento del RDS.

Merritt, T. A., Hallman, M., Bloom, B. T. et al. Prophylactic treatment of very premature infants with human surfactant. *N. Engl. J. Med.* 315:785, 1986; y Simon, N. V., Williams, G. H., Fairbrother, P. F., Elser, R. C. y Perkins, R. P. Prediction of fetal lung maturity by amniotic fluid fluorescence polarization, L/S ratio, and phosphatidylglycerol. *Obstet. Gynecol.* 57:295, 1981.

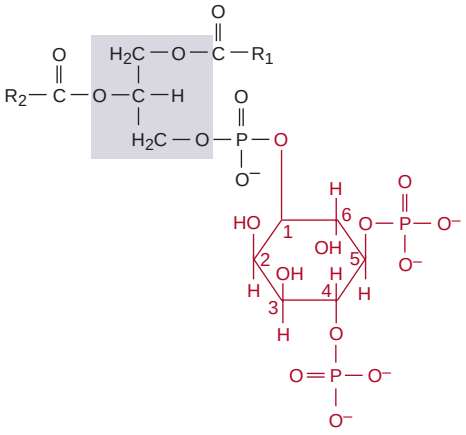


FIGURA 17.10
Estructura del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2 o PtdIns $(4,5)P_2$).

Las propiedades **detergentes** de los fosfolípidos, y en particular de la fosfatidilcolina, juegan un papel importante en la bilis, donde su función es solubilizar el colesterol. Una disminución en la producción de fosfolípido y en su secreción a la bilis puede dar lugar a la formación de cálculos biliares de colesterol y pigmentos biliares. Los fosfolípidos también se utilizan como reserva de lípidos mediadores que regulan muchas rutas y procesos metabólicos. El paso inicial de la liberación de estos mediadores está catalizada, invariablemente, por una fosfolipasa. El fosfatidilinositol y la fosfatidilcolina también actúan como dadores de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y compuestos relacionados.

Los inosítidos intervienen en las transducción de señales

Los fosfolípidos que contienen inositol (inosítidos) desempeñan un papel de gran importancia en los sistemas de transducción de señales. El más importante de estos lípidos es el **fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato** (PIP_2) (Figura 17.10). Al producirse la unión entre ciertos ligandos y sus respectivos receptores en la membrana plasmática de las células de mamíferos (véase Capítulo 21, p. 928), el PIP_2 que se encuentra en la lámina interior de la membrana se convierte en sustrato de una fosfoinositidasa C dependiente de receptor (PIC), que lo hidroliza produciendo dos señales intracelulares (Figura 17.11): el **inositol 1,4,5- trifosfato** (IP_3), que provoca la liberación de Ca^{2+} por parte de unas vesículas especiales del retículo endoplasmático, y el **1,2-diacilglicerol**, que estimula la actividad de la proteína quinasa C (PKC). La eliminación del 5-fosfato de IP_3 elimina la señal, con lo que disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+}. La señal de 1,2-diacilglicerol se elimina por conversión en ácido fosfatídico en una reacción catalizada por la diacilglicerol quinasa, la cual adiciona un grupo fosfato al diacilglicerol (Figura 17.12). Las funciones reguladoras de estos productos de la reacción de la PIC se analizan en el Capítulo 21 (p. 930). Se considera al ácido fosfatídico, producto de la acción de la fosfolipasa D sobre los fosfolípidos, como un segundo mensajero.

Las complejas rutas del metabolismo del inositol fosfato desempeñan tres funciones: (1) eliminación e inactivación de una señal intracelular potente, el IP_3; (2) conservación del inositol; y (3) síntesis de polifosfatos tales como el inositol pentaquisfosfato ($InsP_5$) y el inositol hexaquisfosfato ($InsP_6$), cuyas funciones aún no se han determinado. Dos enzimas metabolizan el inositol 1,4,5-trisfosfato: en primer lugar, una 5-fosfomonoesterasa que convierte el IP_3 en inositol 1,4,-bisfosfato y, en segundo lugar, una 3-quinasa que cataliza la formación de inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato. A su vez, una familia de fosfatasas convierte el Ins$(1,4)P_2$ en *mio*-inositol (Figura 17.12). Finalmente, el inositol vuelve a incorporarse a la reserva fosfolipídica.

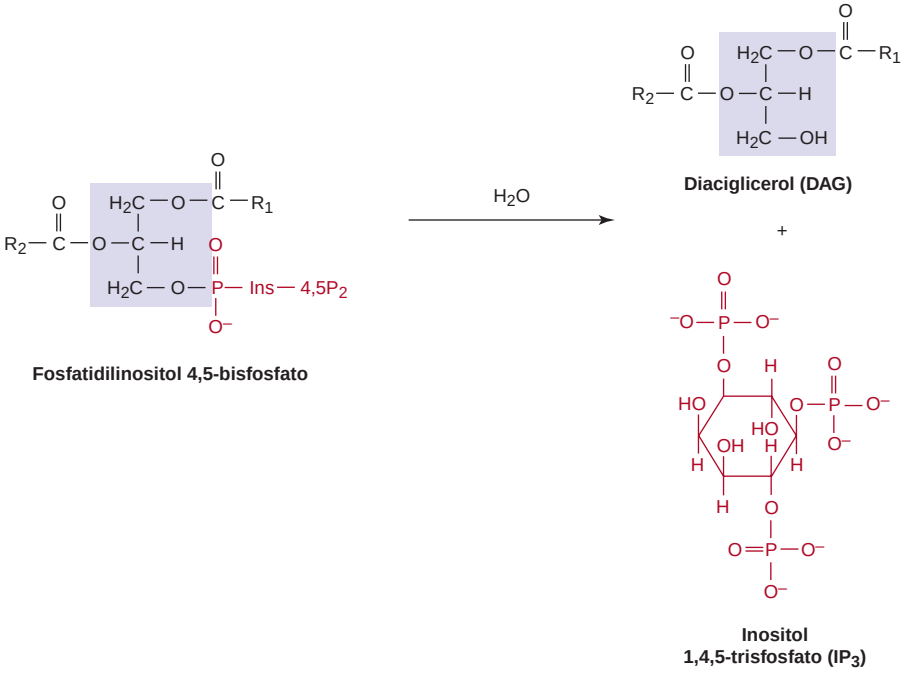


FIGURA 17.11
La producción de 1,2-diacilglicerol y de inositol 1,4,5-trisfosfato mediante la acción de la fosfolipasa C sobre el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

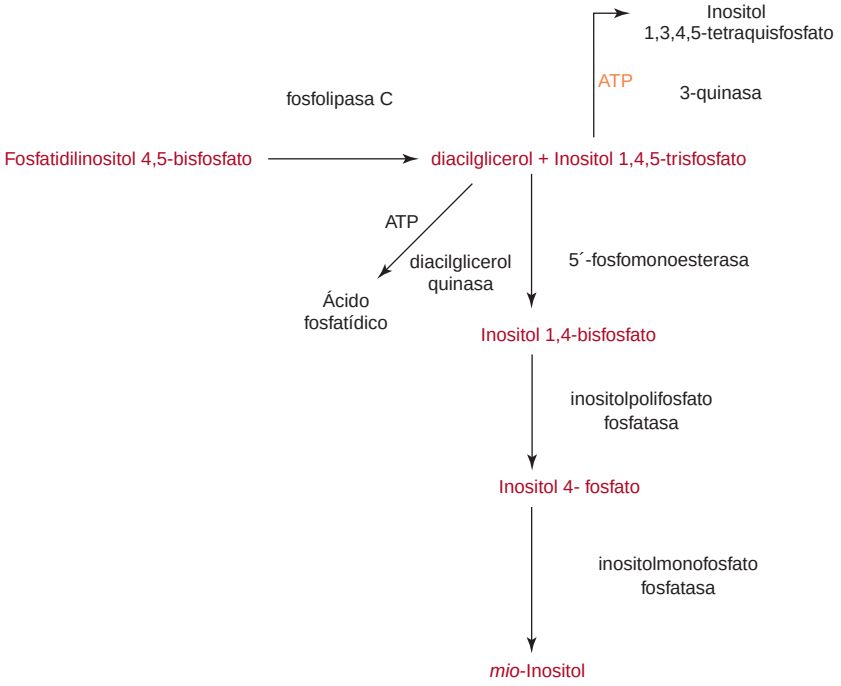


FIGURA 17.12
Rutas para la eliminación del inositol 1,4,5-trisfosfato y del diacilglicerol intracelulares.

El fosfatidilinositol sirve para anclar glucoproteínas a la membrana plasmática

El fosfatidilinositol, además de su papel como componente estructural de las membranas y como fuente de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (p. 772), también se utiliza como ancla para unir algunas glucoproteínas a la superficie externa de la membrana plasmática. En los tripanosomas parásitos (por ejemplo, el *Tripanosoma brucei*, que causa la enfermedad del sueño), la superficie exterior de la membrana plasmática está recubierta de una proteína llamada **glucoproteína variable de superficie** (VSG), unida a la membrana mediante un ancla glucofosfolipídica; en este caso, se trata de fosfatidilinositol (Figura 17.13). Las características estructurales más interesantes de la zona de unión proteínas–lípidos constituida por el **ancla de glucosilfosfatidilinositol** (GPI) son: (1) El grupo diacilglicerol (DAG) del fosfatidilinositol se integra en la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. (2) El residuo inositol se une al grupo DAG a través de un enlace fosfodiéster. (3) El inositol se une a la glucosamina que contiene un grupo amino libre, no acetilado. (4) La presencia de un dominio glucano rico en manosa. (5) Un residuo de fosfoetanolamina se une al extremo carboxilo de la proteína. Dependiendo de la proteína a la que está unido, y del tejido u organismo en el que se expresa, el núcleo de la GPI puede estar decorado con glúcidos adicionales que se extienden a partir de las manosas del núcleo; éstos incluyen manosa, glucosa, galactosa, *N*-acetilgalactosa, ácido *N*-acetilneuramínico y *N*-acetilgalactosamina. Otras proteínas que también se hallan ancladas a la superficie externa de la membrana plasmática son la acetilcolinesterasa, la fosfatasa alcalina y la 5′-nucleotidasa.

El ancla GPI desempeña funciones diversas. En primer lugar, confiere a la proteína con la que se une una movilidad lateral sin restricciones por toda la bicapa lipídica, lo que permite a la proteína desplazarse con gran rapidez a través de la membrana plasmática. En segundo lugar, la presencia de actividad fosfolipasa de tipo C sobre la superficie celular hace que se desprenda la proteína unida al fosfatidilinositol. Por ejemplo, este hecho permite a los tripanosomas eliminar sus antígenos de superficie, cambiar su recubrimiento y, por tanto, escapar a los anticuerpos del sistema inmunitario del huésped. En tercer lugar, la acción de la fosfolipasa C sobre el ancla fosfatidilinositol libera diacilglicerol, un segundo mensajero que

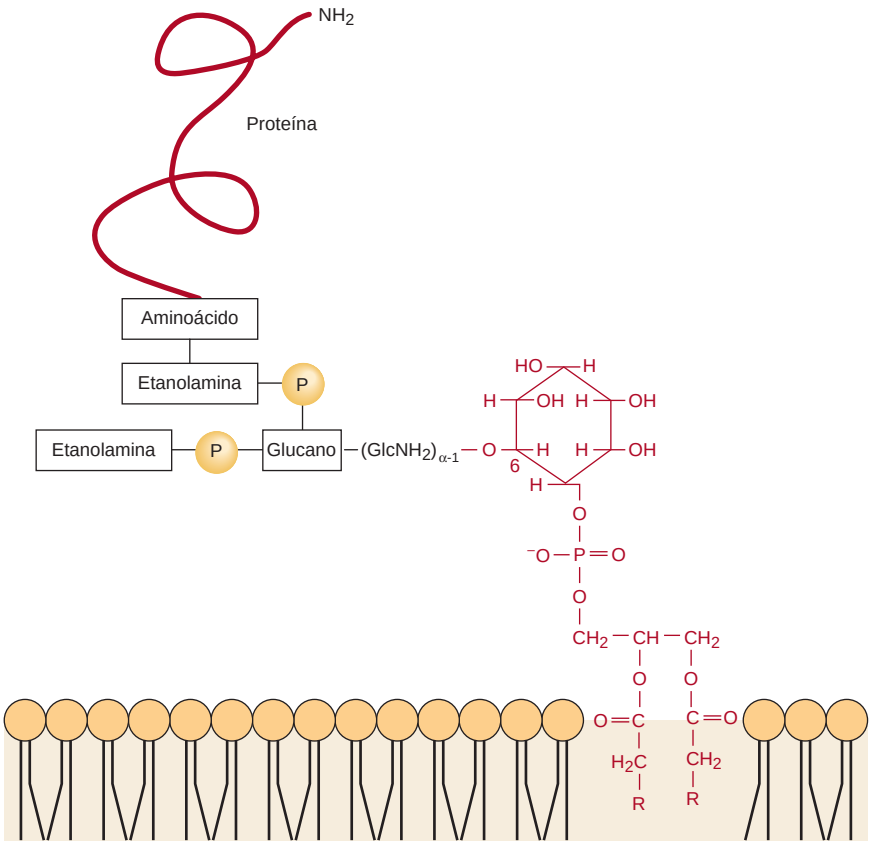


FIGURA 17.13
Estructura de un ancla fosfatidilinositol típica de unión a la membrana. $GlcNH_2$, glucosamina.

puede activar la proteína quinasa C (véase p. 930). La biosíntesis de las anclas GPI ha sido caracterizada extensamente.

Otros tipos de lipidación de proteínas (modificación co- o postraducción de proteínas por lípidos específicos), son la *N*-miristilación en el extremo amino terminal de las proteínas, la *S*-palmitilación en cisteínas internas y la *S*-prenilación por residuos farnesilo o geranilgeranilo en cisteínas situadas en el carboxilo terminal de proteínas.

Biosíntesis de fosfolípidos

El ácido fosfatídico se sintetiza a partir de α-glicerol fosfato y acil CoA graso

El ácido 1-α-fosfatídico (denominado comúnmente ácido fosfatídico) y el 1,2-diacil-*sn*-glicerol son intermediarios comunes en las rutas de biosíntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles (Figura 17.14); ambas rutas comparten algunos enzimas (véase Capítulo 16, p. 707). Prácticamente todas las células son capaces de sintetizar fosfolípidos en cierta medida (excepto los eritrocitos maduros), mientras que la biosíntesis de triacilgliceroles tiene lugar solamente en el hígado, tejido adiposo e intestino. En la mayoría de los tejidos, la ruta para la síntesis de ácido fosfatídico empieza con α-glicerol 3-fosfato (*sn*-glicerol 3-fosfato). La fuente más general de α-glicerol 3-fosfato, especialmente en el tejido adiposo, es la que parte de la reducción del intermediario glucolítico, dihidroxiacetona fosfato, en la reacción catalizada por la α-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa:

$$\text{dihidroxiacetona fosfato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \alpha\text{-glicerol 3-fosfato} + \text{NAD}^+$$

Unos cuantos tejidos especializados, entre ellos el hígado y riñón, obtienen el α-glicerol 3-fosfato mediante la reacción de la glicerol quinasa:

$$\text{glicerol} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \alpha\text{-glicerol 3-fosfato} + \text{ADP}$$

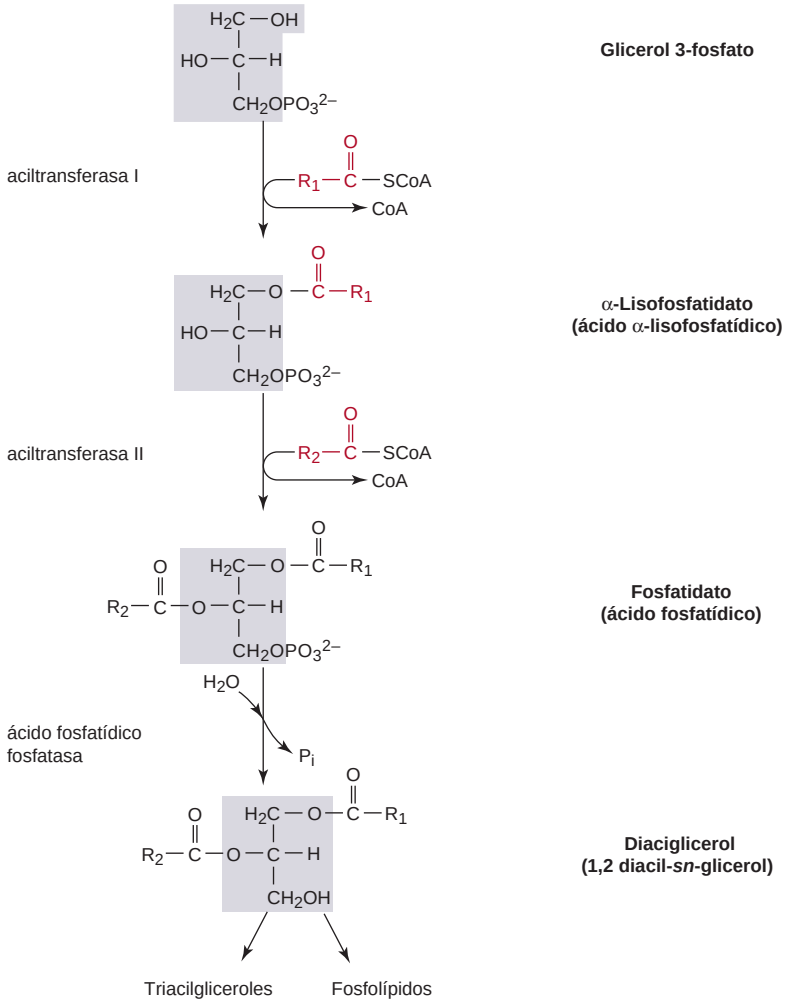


FIGURA 17.14
Biosíntesis del ácido fosfatídico a partir del glicerol 3-fosfato y papel de la ácido fosfatídico fosfatasa en la síntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles.

Los dos pasos siguientes en la biosíntesis del ácido fosfatídico implican la transferencia por etapas de grupos acilo grasos de cadena larga desde el acil CoA graso. La primera aciltransferasa (I) se denomina **glicerol fosfato:aciltransferasa**, y une predominantemente ácidos grasos saturados y ácido oleico a la posición *sn*-1 para producir 1-acilglicerol fosfato o ácido ***α***-lisofosfatídico. El segundo enzima (II), **1-acilglicerol fosfato:aciltransferasa**, cataliza la acilación de la posición *sn*-2, normalmente con un ácido graso insaturado (Figura 17.14). En ambos casos, el dador de grupos acilo, es el derivado tioéster de CoA con el ácido graso de cadena larga apropiado.

La especificidad de las dos aciltransferasas no siempre está de acuerdo con la asimetría de ácidos grasos que se encuentra en los fosfolípidos de una célula determinada. Las reacciones de remodelado que se tratan más adelante modifican la composición de ácidos grasos en las posiciones C-1 y C-2 del glicerol fosfato. La ácido fosfatídico fosfatasa citosólica (también denominada ácido fosfatídico fosfohidrolasa) hidroliza el ácido fosfatídico (1,2-diacilglicerolfosfato) que se genera en el retículo endoplasmático, dando por consiguiente lugar a 1,2-diacil-*sn*-glicerol, que sirve como punto de ramificación en la síntesis de triacilgliceroles y de fosfolípidos (Figura 17.14). El ácido fosfatídico también se puede formar mediante una segunda vía que empieza con la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Ésta es corrientemente una vía alternativa de apoyo empleada por algunos tejidos para producir ácido fosfatídico.

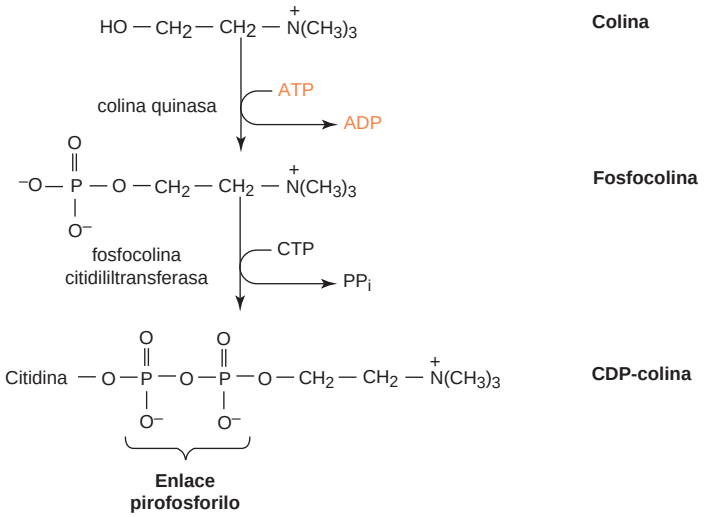


FIGURA 17.15
Biosíntesis de la CDP-colina a partir de la colina.

Fosfolípidos específicos se sintetizan mediante adición de una base al ácido fosfatídico

La principal ruta biosintética de fosfatidilcolina (lecitina) implica la conversión secuencial de colina a fosfocolina, citidina difosfato (CDP)-colina y fosfatidilcolina. En esta ruta, el grupo polar de cabeza de la fosfocolina es activado con citidina trifosfato (CTP) según las siguientes reacciones. En primer lugar el ATP fosforila la colina libre, en una reacción catalizada por la colina quinasa (Figura 17.15). La colina constituye una necesidad dietética para la mayoría de los mamíferos. La fosfocolina se convierte en CDP-colina a expensas del CTP en una reacción catalizada por la **fosfocolina citidililtransferasa**. Nótese que el pirofosfato inorgánico (PP_i) es un producto de la reacción. El enlace pirofosforilo rico en energía de la CDP-colina es muy inestable y reactivo, de tal forma que la porción fosfocolina puede transferirse fácilmente al centro nucleofílico aportado por el grupo OH en posición 3 del 1,2-diacilglicerol, reacción catalizada por la colina fosfotransferasa (Figura 17.16). Esta es la ruta principal de síntesis de dipalmitil-lecitina en los pulmones.

El paso limitante de velocidad en la biosíntesis de fosfatidilcolina es la reacción de la citidililtransferasa, en la que se forma CDP-colina (Figura 17.15). Este enzima está regulado por un mecanismo nuevo que implica el intercambio del enzima entre el citosol y el retículo endoplasmático. La forma citosólica de la citidililtransferasa es inactiva, y parece actuar como reserva del enzima; cuando el enzima se une a la membrana, se activa. La translocación de la citidililtransferasa del citosol al retículo endoplasmático es regulada por el cAMP y por los acil CoA grasos. La fosforilación reversible del enzima, por una quinasa dependiente de cAMP, provoca su

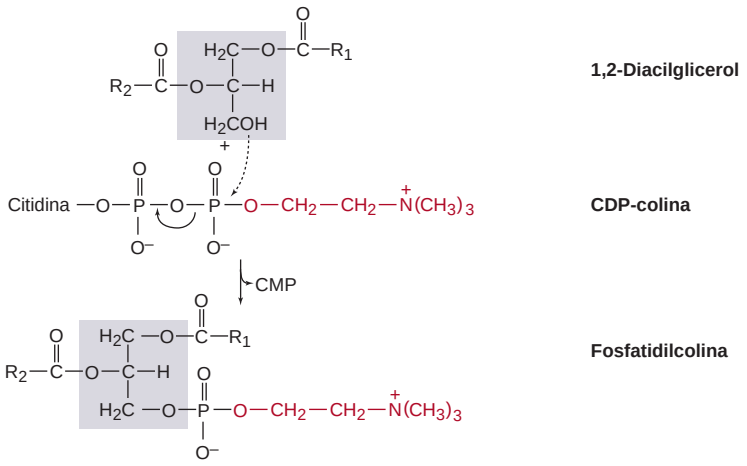


FIGURA 17.16
Reacción de la colina fosfotransferasa.

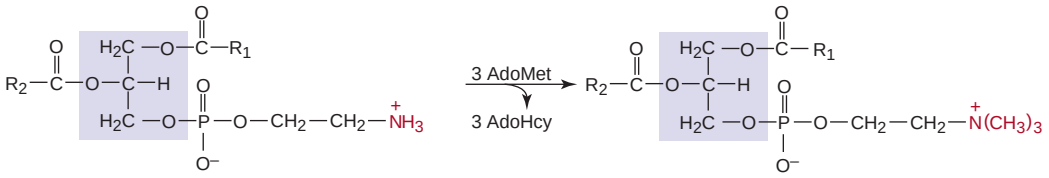


FIGURA 17.17
Biosíntesis de la fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina, *S*-adenosilmetionina (AdoMet) y *S*-adenosilhomocisteína (AdoHcy).

liberación de la membrana y su inactivación. La desfosforilación posterior provoca de nuevo la unión de la citidililtransferasa a la membrana y su activación. Los acil CoA grasos activan el enzima, promoviendo su unión al retículo endoplasmático. Sólo en el hígado, la fosfatidilcolina puede también formarse por metilación repetida de fosfatidiletanolamina. La **fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferasa**, del retículo endoplasmático, cataliza la transferencia de grupos metilo, de uno en uno desde la ***S*-adenosilmetionina (AdoMet)** a la fosfatidiletanolamina para producir fosfatidilcolina (Figura 17.17). Se desconoce si están implicados uno o más enzimas en estas transferencias de metilo.

La ruta principal para la síntesis de fosfatidiletanolamina en el hígado y en el cerebro implica al enzima **etanolamina fosfotransferasa**, del retículo endoplasmático, que cataliza la reacción mostrada en la Figura 17.18. Este enzima es especialmente abundante en el hígado. La CDP-etanolamina se forma a través de la reacción catalizada por la **etanolamina quinasa**:

$$\text{etanolamina} + \text{ATP} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{fosfoetanolamina} + \text{ADP}$$

y la reacción de la **fosfoetanolamina citidililtransferasa**:

$$\text{fosfoetanolamina} + \text{CTP} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{CDP-etanolamina} + PP_i$$

Las mitocondrias del hígado también generan fosfatidiletanolamina por descarboxilación de la fosfatidilserina; sin embargo, se cree que ésta es solamente una ruta minoritaria (Figura 17.19).

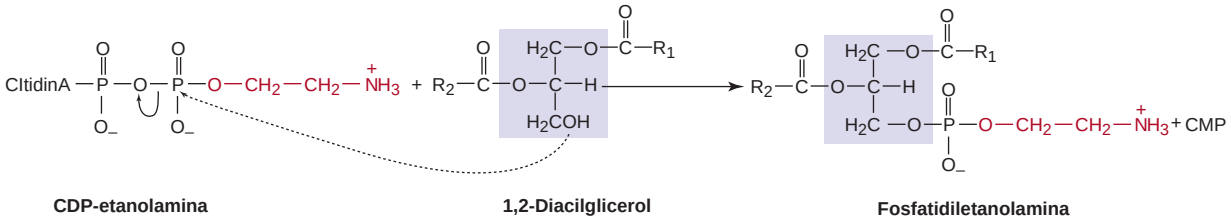


FIGURA 17.18
Biosíntesis de la fosfatidiletanolamina a partir de CDP-etanolamina y diacilglicerol; la reacción es catalizada por la etanolamina fosfotransferasa.

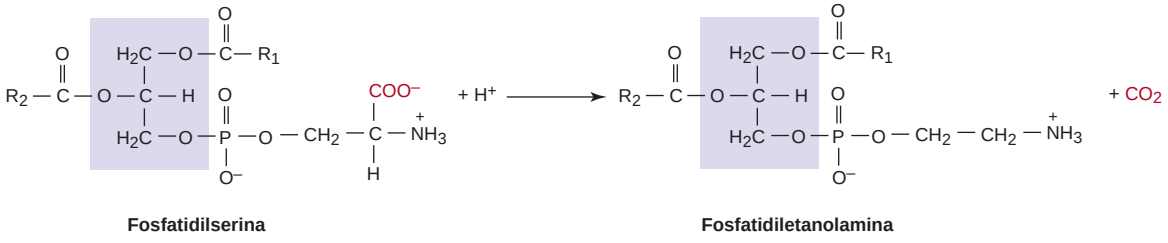


FIGURA 17.19
Formación de fosfatidiletanolamina por descarboxilación de la fosfatidilserina.

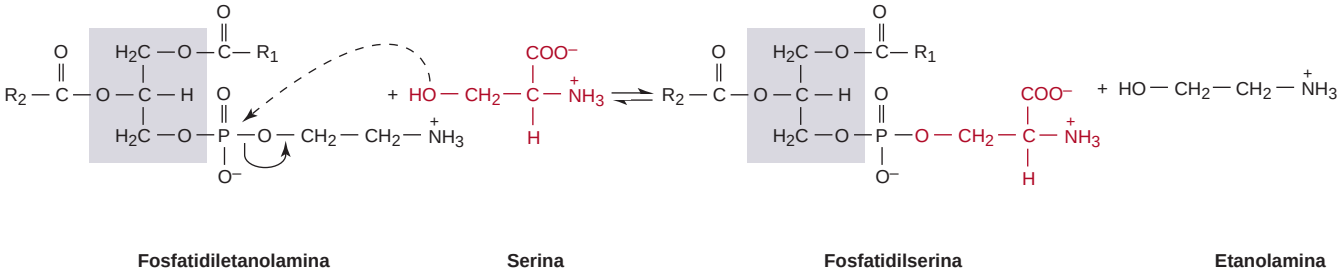


FIGURA 17.20
Biosíntesis de la fosfatidilserina a partir de serina y fosfatidiletanolamina mediante "intercambio de bases".

La fuente principal de fosfatidilserina en los tejidos de los mamíferos proviene de la reacción de "intercambio de bases" (Figura 17.20), en la que la cabeza polar de la fosfatidiletanolamina se intercambia por serina. Dado que no se produce cambio neto en el número o clase de enlaces, esta reacción es reversible y no precisa de ATP ni de ningún otro compuesto de alto contenido energético. Esta reacción se inicia con el ataque del grupo hidroxilo de la serina sobre el enlace fosfodiéster de la fosfatidiletanolamina.

El fosfatidilinositol se produce vía CDP-diacilglicerol y *mio*-inositol libre (Figura 17.21), en una reacción catalizada por la **fosfatidilinositol sintasa**, otro enzima del retículo endoplasmático.

La distribución asimétrica de ácidos grasos en los fosfolípidos se debe a reacciones de remodelado

En muchos tejidos se encuentran dos fosfolipasas, fosfolipasa A_1 y fosfolipasa A_2, y cada una de ellas juega un papel en la formación de las estructuras fosfolipídicas específicas que contienen las clases adecuadas de ácidos grasos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2. Se ha encontrado que la mayoría de las acil-CoA graso transferasas y enzimas sintetizadores de fosfolípidos anteriormente tratados carecen de la especificidad requerida para justificar la posición asimétrica o distribución de ácidos grasos halladas en los fosfolípidos de muchos tejidos. Es decir, los ácidos grasos que se encuentran en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de los diversos fosfolípidos no son, a menudo, los mismos que los que se transfirieron al esqueleto del glicerol en las reacciones de las aciltransferasas iniciales de la biosíntesis de los fosfolípidos. Las **fosfolipasas A_1** y **A_2** catalizan las reacciones indicadas en la Figura 17.22, en donde X representa el grupo de la cabeza polar de un fosfolípido. Los productos de la acción de las fosfolipasas A_1 y A_2 se denominan lisofosfátidos.

Si es necesario que una célula elimine algún ácido graso no deseado, tal como el ácido esteárico de la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina, y reemplazarlo por otro más insaturado como el ácido araquidónico, entonces se puede recurrir a la acción de la fosfolipasa A_2, seguida por una reacción de reacilación. La inserción del ácido araquidónico en la posición 2 de la *sn*-2-lisofosfatidilcolina puede conseguirse bien por acilación directa con araquidonil CoA, proceso en el que interviene la **araqui-**

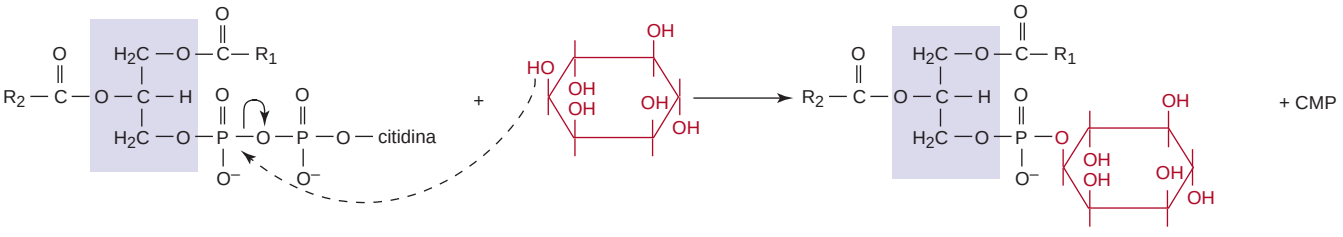


FIGURA 17.21
Biosíntesis del fosfatidilinositol.

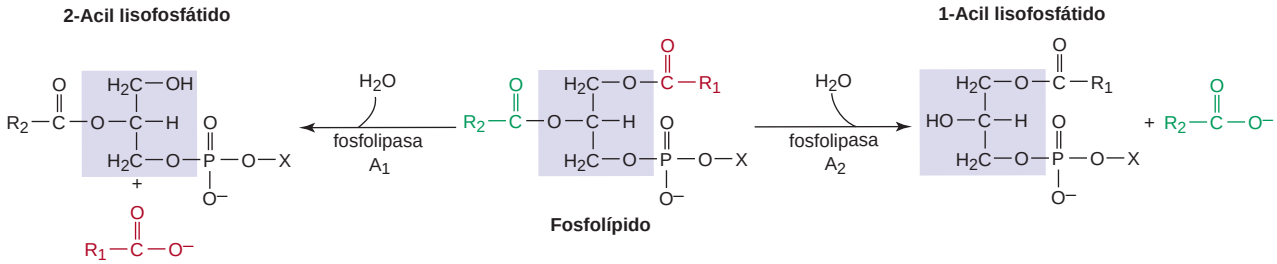


FIGURA 17.22
Reacciones catalizadas por la fosfolipasa A_1 y la fosfolipasa A_2.

donil-CoA transacilasa (Figura 17.23), o a partir de algún otro fosfolípido que contenga ácido araquidónico, mediante una reacción de intercambio (Figura 17.24) catalizada por la **lisolecitina:lecitina aciltransferasa** (LLAT) (Figura 17.24). Dado que no se produce cambio ni en el número ni en la naturaleza de los enlaces involucrados en los productos y reactivos, no hay necesidad de ATP para esta reacción. La reacilación de la lisofosfatidilcolina a partir de acil CoA es la principal ruta de remodelado de la fosfatidilcolina.

Los lisofosfolípidos, en especial *sn*-1-lisofosfatidilcolina, también pueden servir como fuente de ácidos grasos en las reacciones de remodelado. En la Figura 17.25 se muestran los que están implicados en la síntesis de dipalmitil-lecitina (tensioactivo) a partir de 1-palmitil-2-oleilfosfatidilcolina. Obsérvese que *sn*-1-palmitil lisolecitina es la fuente de ácido palmítico en la reacción de intercambio de la aciltransferasa.

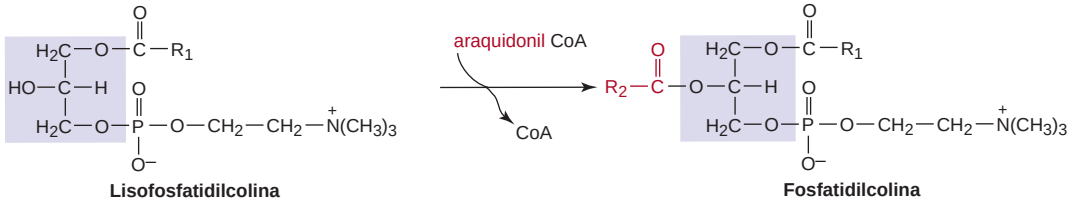


FIGURA 17.23
Síntesis de la fosfatidilcolina por reacilación de la lisofosfatidilcolina, donde $R_2-C(=O)-O-$ **representa ácido araquidónico.**
Esta reacción es catalizada por la acil-CoA:1-acilglicerol-3-fosfocolina *O*-aciltransferasa.

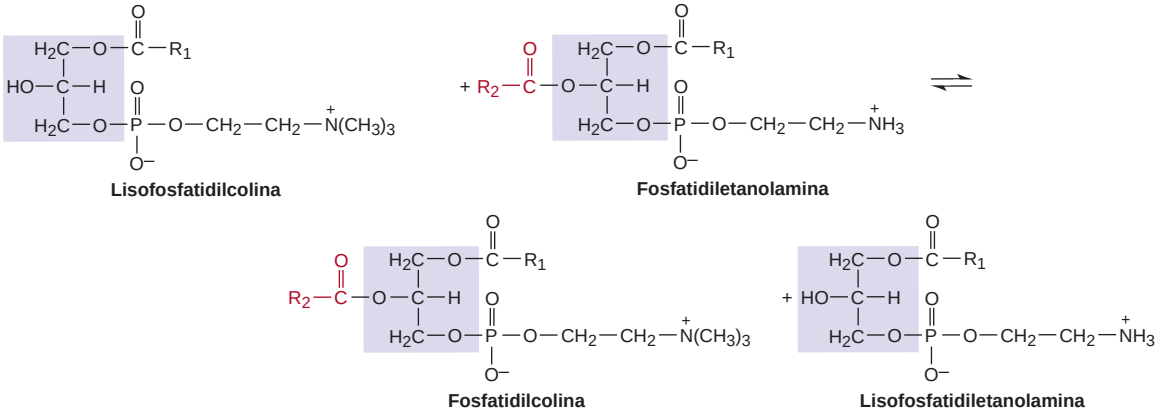


FIGURA 17.24
Formación de la fosfatidilcolina por intercambio de lisolecitina, donde $R_2-C(=O)-O-$ **representa ácido araquidónico.**

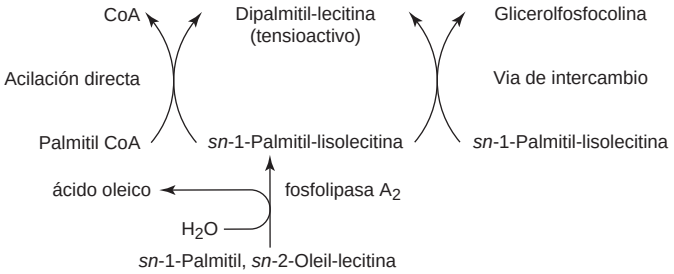


FIGURA 17.25
Dos vías para la biosíntesis de dipalmitil-lecitina a partir de *sn*-1 palmitil-lisolecitina.

Los plasmalógenos se sintetizan a partir de alcoholes grasos

Los éter glicerolípidos se sintetizan a partir de DHAP, ácidos y alcoholes grasos de cadena larga. Las reacciones se resumen en la Figura 17.26. La acildihidroxiacetona fosfato se forma mediante la **acil-CoA:dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa** (enzima 1), que actúa sobre la dihidroxiacetona fosfato y el acil CoA graso de cadena larga. El enlace éter se introduce a través de la **alquildihidroxiacetona fosfato sintasa** (Figura 17.26, enzima 2), que reemplaza el grupo 1-*O*-acilo de la acildihidroxiacetona fosfato por un alcohol graso de cadena larga. La sintasa se encuentra en los peroxisomas. La síntesis del plasmalógeno se completa mediante la transferencia de un ácido graso de cadena larga desde su dador CoA respectivo hasta la posición *sn*-2 del 1-alquil-2-liso-*sn*-glicerol-3-fosfato (Figura 17.26, reacción 4). Los pacientes afectados por la enfermedad de Zellweger carecen de peroxisomas, por lo que no pueden sintetizar cantidades adecuadas de plasmalógeno.

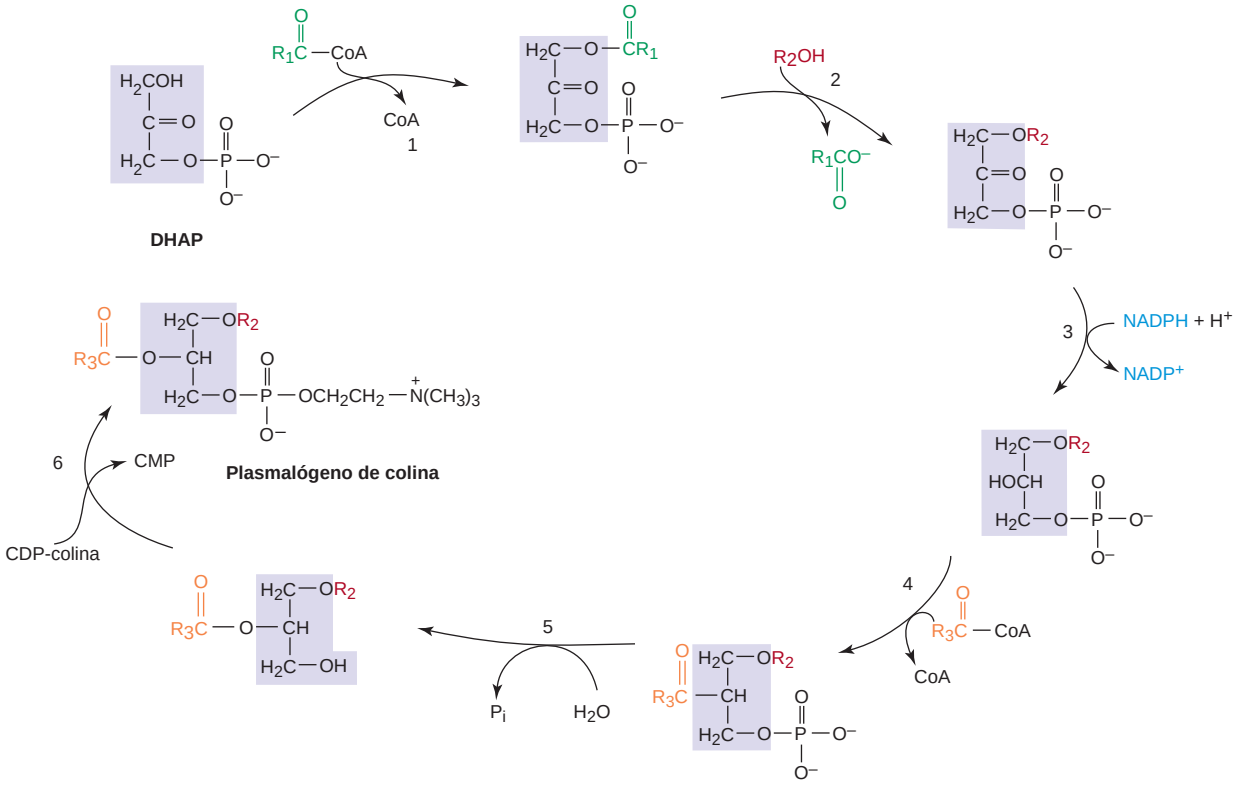


FIGURA 17.26
Ruta de biosíntesis del plasmalógeno de colina a partir de DHAP.
1, Acil-CoA:dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa; 2, alquildihidroxiacetona fosfato sintasa; 3, NADPH: alquildihidroxiacetona fosfato oxidorreductasa; 4, acil-CoA:1-alquil-2-liso-*sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferasa; 5, 1-alquil-2-acil-*sn*-glicerol-3-fosfato fosfohidrolasa; 6, CDP-colina:1-alquil-2-acil-*sn*-glicerol colinafosfotransferasa.

17.3 COLESTEROL

El colesterol, compuesto alicíclico, está ampliamente distribuido tanto en forma libre como esterificada

El colesterol es un compuesto alicíclico cuya estructura comprende (1) el núcleo de perhidrociclopentanofenantreno, con sus cuatro anillos fusionados, (2) un solo grupo hidroxilo en la posición C-3, (3) un centro insaturado entre los átomos de carbono 5 y 6, (4) una cadena hidrocarbonada ramificada de ocho carbonos y unida al anillo D en la posición 17 y (5) un grupo metilo (designado C-19) unido a la posición 10 y otro grupo metilo (designado C-18) unido a la posición 13 (véanse Figuras 17.27 y 17.28).

El colesterol es un lípido muy poco soluble en agua: a 25 °C, el límite de solubilidad es de aproximadamente 0,2 mg/100 mL, es decir 4,7 mM. La concentración de colesterol en el plasma de individuos sanos es normalmente de 150 a 200 mg/100 mL, lo que constituye una concentración doble de la concentración normal de glucosa sanguínea. La elevada solubilidad del colesterol en la sangre se debe a la presencia de las lipoproteínas plasmáticas (principalmente LDL y VLDL), que tienen la capacidad de fijar y por tanto de solubilizar, grandes cantidades de colesterol (véase p. 745). De hecho, sólo aproximadamente un 30% del colesterol plasmático total se encuentra libre (sin esterificar); aproximadamente el 70% del colesterol de las lipoproteínas plasmáticas se encuentra en forma de **ésteres de colesterol**, en los que algún ácido graso de cadena larga, normalmente el ácido linoleico, se halla unido mediante un enlace éster al grupo OH del carbono-3 del anillo A. La presencia del residuo de ácido graso de cadena larga incrementa la hidrofobicidad del colesterol (Figura 17.29).

El colesterol es un componente ubicuo y esencial en las membranas celulares de los mamíferos. El colesterol también es abundante en la bilis, en donde su concentración normal es de 390 mg/100 mL. Sólo el 4% del colesterol de la bilis está esterificado con algún ácido graso de cadena larga. La bilis no contiene cantidades apreciables de ninguna de las lipoproteínas, y la solubilización del colesterol libre se consigue, en parte, por las propiedades detergentes de los fosfolípidos presentes en la bilis y que provienen del hígado (véase p. 1105). Una perturbación crónica del metabolismo fosfolipídico del hígado puede dar lugar a la deposición de cálculos ricos en colesterol. Las sales biliares, que son metabolitos del colesterol, también ayudan a mantener al colesterol en solución en la bilis. Al parecer, el colesterol también protege las membranas de la vesícula biliar de los efectos irritantes o dañinos de las sales biliares.

En el laboratorio clínico se determina el colesterol total mediante la reacción de Liebermann–Burchard. Las proporciones de colesterol libre y esterificado se pueden determinar mediante cromatografía gas–líquido o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa.

El colesterol es un componente de la membrana y es el precursor de las sales biliares y de las hormonas esteroides

El colesterol, que puede provenir de la dieta o de la síntesis *de novo* en prácticamente todas las células humanas, juega varios papeles importantes. Es el esterol mayoritario en el hombre, y es un componente de virtualmente todas las membranas plasmáticas e intracelulares. El colesterol es particularmente abundante en las estructuras mielinadas del cerebro y del sistema nervioso central, pero está también

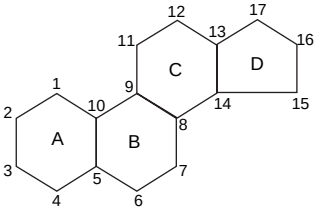


FIGURA 17.27
Núcleo del ciclopentanofenantreno.

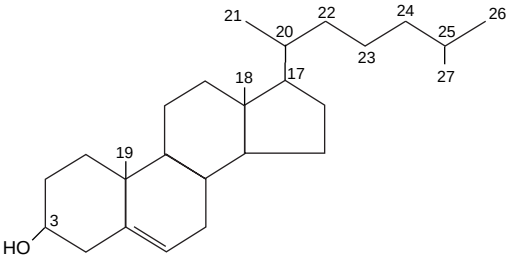


FIGURA 17.28
Estructura del colesterol (5-colesten-3β-ol).

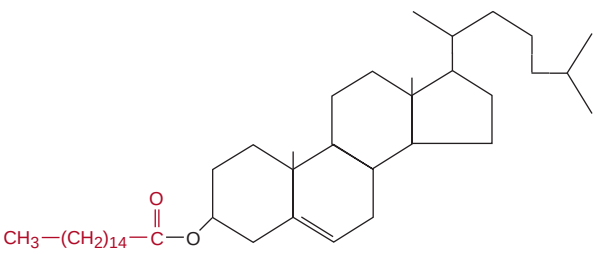


FIGURA 17.29
Estructura del éster (palmitilo) del colesterol.

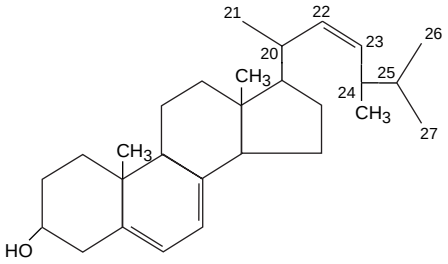


FIGURA 17.30
Estructura del ergosterol.

presente en pequeñas cantidades en la membrana interna de la mitocondria (véase p. 501). A diferencia de lo que ocurre en el plasma, la mayor parte del colesterol de las membranas celulares se encuentra en forma libre, no esterificada.

El colesterol es el precursor inmediato de los **ácidos biliares** que se sintetizan en el hígado y que actúan facilitando la absorción de los triacilgliceroles y vitaminas liposolubles de la dieta (véase p. 1105). La estructura anular del colesterol no se puede metabolizar hasta CO_2 y agua en el hombre. La ruta de excreción del colesterol se lleva a cabo mediante el hígado y la vesícula biliar a través del intestino en forma de ácidos biliares.

Otro papel fisiológico del colesterol es el de precursor de diversas **hormonas esteroides** (véase p. 963). La progesterona es la hormona sexual de tipo ceto-esteroide de 21 carbonos secretada por el cuerpo lúteo del ovario y por la placenta. Los corticosteroides metabólicamente potentes de la corteza adrenal provienen del colesterol; entre ellos se cuentan la desoxicorticosterona, corticosterona, cortisol y cortisona. El mineralocorticoide aldosterona se obtiene del colesterol en la zona glomerulosa del córtex de la glándula adrenal. El colesterol también sirve de precursor de las hormonas esteroides femeninas, (los estrógenos, p. ej., estradiol), en el ovario, y de los esteroides masculinos (p. ej., testosterona), en los testículos. Aunque todas las hormonas esteroides están relacionadas estructuralmente y provienen bioquímicamente del colesterol, poseen propiedades fisiológicas muy diferentes relacionadas con el ciclo menstrual, la espermatogénesis, embarazo, lactancia y parto, equilibrio mineral y metabolismo energético (aminoácidos, glúcidos y grasas).

Asimismo, el esqueleto hidrocarbonado del colesterol se encuentra en los esteroles de las plantas; citemos, por ejemplo, el ergosterol, un precursor de la vitamina D. En la piel, el **ergosterol** (Figura 17.30). se convierte en vitamina D_2 por la acción de los rayos ultravioleta. Dicha vitamina está relacionada con el metabolismo del calcio y del fósforo (véase p. 1141).

El colesterol se sintetiza a partir del acetil CoA

Aunque la biosíntesis *de novo* tiene lugar virtualmente en todas las células, esta capacidad es mayor en el hígado, intestino, corteza suprarrenal y tejidos reproductores, entre los que se incluyen ovarios, testículos y placenta. De la inspección de su estructura es evidente que la biosíntesis del colesterol requiere una fuente de átomos de carbono y un considerable poder reductor para poder generar los numerosos enlaces carbono–carbono y carbono–hidrógeno. Todos los átomos de carbono del colesterol provienen del acetato. El poder reductor en forma de NADPH es proporcionado principalmente por los enzimas de la desviación de las hexosas monofosfato, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (p. 666). La ruta de síntesis del colesterol tiene lugar en el citosol y en el retículo endoplasmático, y es impulsada en gran parte por la hidrólisis de los enlaces tioéster de alta energía del acetil CoA y los enlaces fosfoanhídrido del ATP.

El ácido mevalónico es un intermediario clave

El primer compuesto exclusivo de la ruta de la biosíntesis del colesterol es el ácido mevalónico que proviene del acetil CoA. El acetil CoA se puede obtener de diversos orígenes: (1) β-oxidación de ácidos grasos de cadena larga (véase p. 714); (2) oxidación de aminoácidos cetogénicos, tales como la leucina e isoleucina (véase p. 811); y (3) reacción de la piruvato deshidrogenasa. El acetato libre puede ser activado a su derivado tioéster a expensas del ATP por el enzima **acetoquinasa**, denominado también **acetato tioquinasa**:

$$\text{ATP} + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CoASH} \longrightarrow \text{CH}_3\text{—}\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}\text{—SCoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Las dos primeras reacciones de la vía de síntesis del colesterol están compartidas por la ruta que también produce cuerpos cetónicos (p. 720). Dos moléculas de acetil CoA se condensan formando acetoacetil CoA en una reacción catalizada por la **acetoacetil-CoA tiolasa (acetil-CoA:acetil-CoA acetiltransferasa):**

$$\text{CH}_3\text{—}\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}\text{—SCoA} + \text{CH}_3\text{—}\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}\text{—SCoA} \longrightarrow \text{CH}_3\text{—}\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}\text{—CH}_2\text{—}\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}\text{—SCoA} + \text{CoA—SH}$$

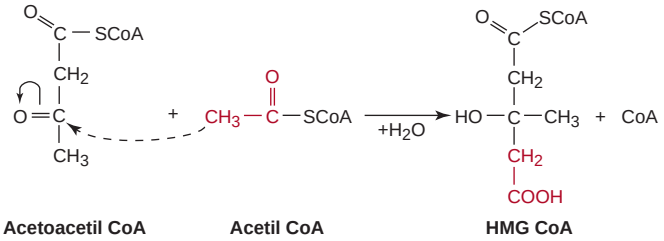


FIGURA 17.31
Reacción de la HMG-CoA sintasa.

La formación del enlace carbono–carbono del acetoacetil CoA está favorecida energéticamente por la rotura de un enlace tioéster y la generación de coenzima A libre.

El siguiente paso introduce una tercera molécula de acetil CoA formando el compuesto ramificado **3-hidroxi-3-metilglutaril CoA** (HMG CoA) (Figura 17.31). Esta reacción de condensación es catalizada por la **HMG-CoA sintasa (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA:acetoacetil-CoA liasa)**. Las células del parénquima hepático contienen dos formas isoenzimáticas de la HMG-CoA sintasa; una de ellas se encuentra en el citosol y está implicada en la síntesis del colesterol, mientras que la otra tiene una localización mitocondrial y funciona en la vía de formación de los cuerpos cetónicos (p. 720). En la reacción de la HMG-CoA sintasa, tiene lugar una condensación aldólica entre el carbono del metilo del acetil CoA y el grupo β-carbonilo del acetoacetil CoA, con la hidrólisis simultánea del enlace tioéster del acetil CoA. El enlace tioéster en la molécula original de acetoacetil CoA permanece intacto. El HMG CoA también se puede formar a partir de la degradación oxidativa del aminoácido ramificado leucina, la cual tiene lugar a través de los intermedios 3-metilcrotonil CoA y 3-metilglutaconil CoA (p. 813).

El paso que produce específicamente el compuesto ácido mevalónico a partir del HMG CoA está catalizado por el importante enzima microsómico **HMG-CoA reductasa** (mevalonato:$NADP^+$ oxidorreductasa), que presenta una necesidad absoluta de NADPH como reductor (Figura 17.32). Este paso reductor consume dos moléculas de NADPH, produce la hidrólisis del enlace tioéster del HMG-CoA, y genera un residuo de alcohol primario en el mevalonato. Esta reacción de reducción es irreversible, y da *R*-(+) mevalonato, que contiene seis átomos de carbono. La HMG CoA reductasa cataliza el paso limitante de velocidad en la ruta de la biosíntesis del colesterol. La HMG-CoA reductasa es una proteína intrínseca de la membrana del retículo endoplasmático, cuyo extremo carboxilo se extiende hasta el interior del citosol y contiene el sitio activo del enzima. La fosforilación regula la actividad celular de la HMG-CoA reductasa disminuyendo su actividad catalítica ($V_{máx}$), y elevando su velocidad de degradación al incrementar su susceptibilidad a los ataques proteolíticos. Una elevada concentración de colesterol intracelular estimula la fosforilación de la HMG-CoA reductasa.

El papel central de la HMG-CoA reductasa en la homeostasis del colesterol se pone de manifiesto por la efectividad de una familia de fármacos denominados estatinas en la disminución de los niveles de colesterol plasmático. Las estatinas (p. ej., lovastatina, pravastatina, fluvastatina, cerivastatina y atorvastatina) inhiben la actividad de la HMG-CoA reductasa, especialmente en el hígado, y generalmente disminuyen el colesterol plasmático total hasta en un 50%.

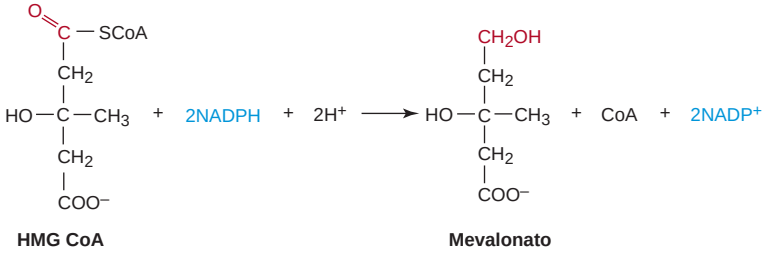


FIGURA 17.32
Reacción de la HMG-CoA reductasa.

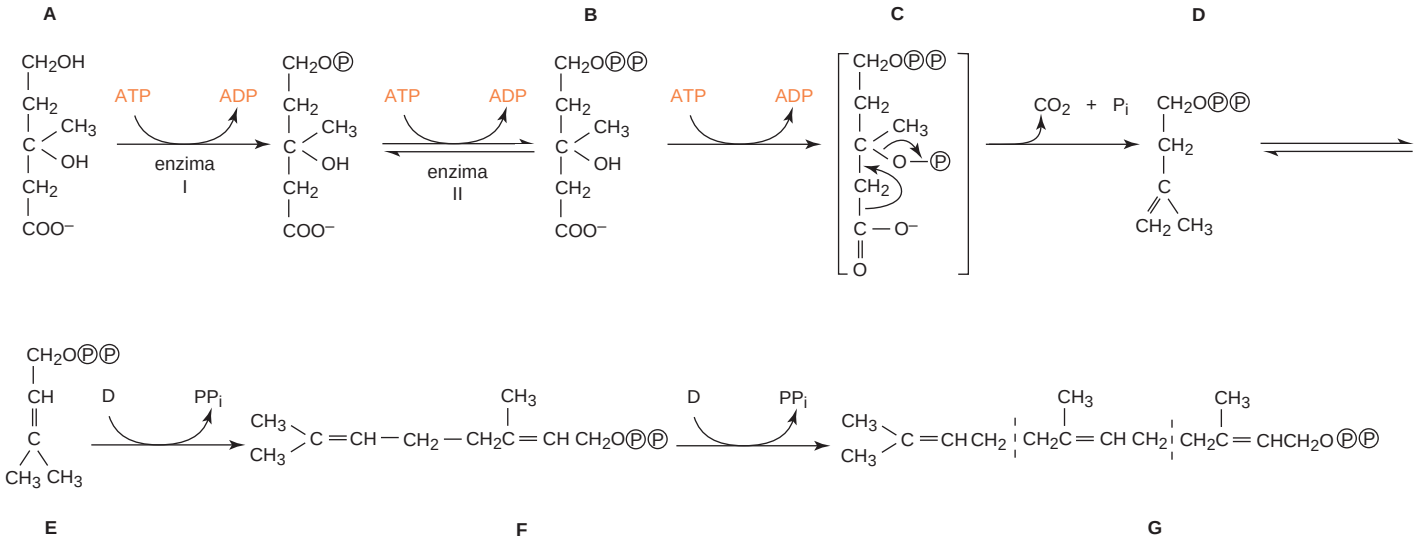


FIGURA 17.33
Formación del farnesil pirofosfato (F) a partir de mevalonato (A).
Las líneas de puntos dividen las moléculas en unidades derivadas del isopreno. D es el 3-isopentenilpirofosfato.

El ácido mevalónico es un precursor del farnesil pirofosfato

Las reacciones involucradas en la conversión del mevalonato en **farnesil pirofosfato** se resumen en la Figura 17.33. La transferencia escalonada del grupo fosfato terminal de dos moléculas de ATP al mevalonato (A) para formar 5-pirofosfomevalonato (B) está catalizada por la **mevalonato quinasa** (enzima 1) y por la **fosfomevalonato quinasa** (enzima 2). El paso siguiente efectúa la descarboxilación del 5-pirofosfomevalonato, generando así Δ^3-isopentenil pirofosfato (D); esta reacción está catalizada por la **pirofosfomevalonato descarboxilasa**. Se cree que en esta reacción, dependiente de ATP, y en la que se producen ADP, P_i y CO_2, la descarboxilación–deshidratación transcurre a través del intermedio trifosfatado, 3-fosfomeva-

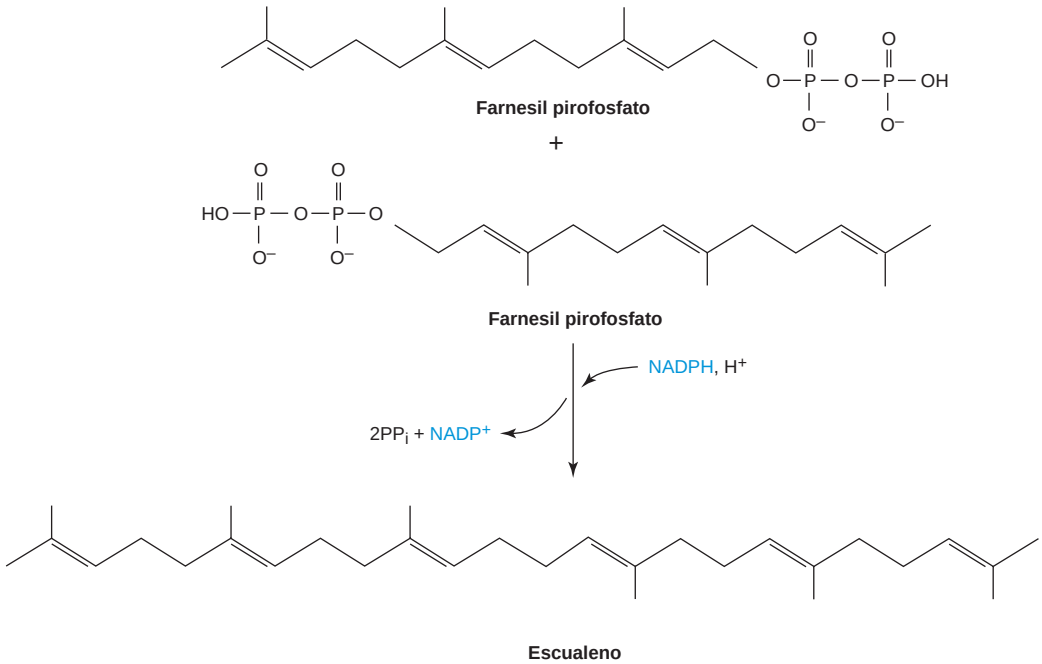


FIGURA 17.34
Formación del escualeno a partir de dos moléculas de farnesil pirofosfato.

lonato 5-pirofosfato (C). El isopentenil pirofosfato se transforma en su isómero alílico 3,3-dimetilalil pirofosfato (E), en una reacción reversible catalizada por la **isopentenil pirofosfato isomerasa**. La condensación del 3,3-dimetilalilpirofosfato (E) y el 3-isopentenil pirofosfato (D) genera el geranilpirofosfato (F).

La condensación escalonada de tres unidades pentacarbonadas de isopentenilo para formar la unidad de 15 carbonos farnesil pirofosfato (G) está catalizada por un enzima, una prenil transferasa citosólica denominada geranil transferasa.

El colesterol se forma a partir del farnesil pirofosfato vía escualeno

Los últimos pasos de la biosíntesis del colesterol suponen la fusión "cabeza-cabeza" de dos moléculas de farnesil pirofosfato para formar el **escualeno**, y finalmente la ciclación de éste para dar colesterol. La reacción que produce la molécula de 30 carbonos del escualeno a partir de dos porciones farnesil pirofosfato de 15 carbonos (Figura 17.34) es diferente de las reacciones de formación de enlaces carbono–carbono previas en la vía (Figura 17.33). La **escualeno sintasa**, presente en el retículo endoplasmático, libera dos grupos pirofosfato, con pérdida de un átomo de hidrógeno de una molécula de farnesil pirofosfato y reemplazamiento por un hidrógeno del NADPH. Entre el farnesil pirofosfato y el escualeno existen seguramente diversos intermediarios diferentes. Mediante rotación de los enlaces carbono–carbono sencillos, puede obtenerse la conformación del escualeno indicada en la Figura 17.35. Obsérvese el parecido de la forma global del compuesto con el colesterol. Obsérvese también que el escualeno carece de átomos de oxígeno.

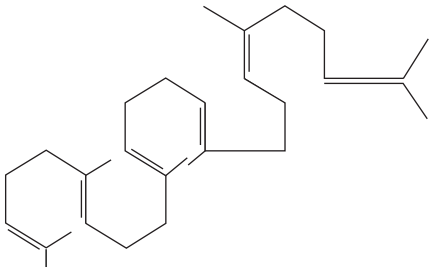


FIGURA 17.35
Estructura del escualeno, C_{30}.

La biosíntesis del colesterol a partir del escualeno transcurre a través del intermedio **lanosterol**, que contiene el sistema anular tetracíclico fusionado y una cadena lateral de ocho carbonos:

$$\text{escualeno} \rightarrow \text{escualeno 2,3-epóxido} \rightarrow \text{lanosterol}$$

Los múltiples enlaces carbono–carbono que se forman durante la ciclación del escualeno se generan de forma concertada, tal y como se indica en la Figura 17.36. El grupo OH del lanosterol se proyecta por encima del plano del anillo A; esto se conoce como orientación β. Los grupos que se extienden por debajo del anillo en una relación trans con el grupo-OH se designan α, y se representan por una línea punteada. Durante esta secuencia de reacciones, se añade un grupo hidroxilo al C-3, dos grupos metilo experimentan desplazamientos, y se elimina un protón. El átomo de oxígeno proviene del oxígeno molecular. La reacción es catalizada por un enzima del retículo endoplasmático denominado **escualeno oxidociclasa**, que está compuesto por, al menos, dos actividades, una escualeno epoxidasa o monooxigenasa y una ciclasa (lanosterol ciclasa).

El proceso de ciclación se inicia con la formación de un epóxido entre lo que será el C-2 y el C-3 del colesterol, a expensas de NADPH:

$$\text{escualeno} + O_2 + \text{NADPH} + H^+ \rightarrow \text{escualeno 2,3-epóxido} + H_2O + \text{NADP}^+$$

Esta reacción está catalizada por el componente monooxigenasa o epoxidasa. La hidroxilación en C-3 a través del epóxido intermedio desencadena la ciclación del escualeno para formar el lanosterol (Figura 17.36). En el proceso de ciclación, dos átomos de hidrógeno y dos grupos metilo se desplazan a posiciones vecinas.

La transformación del lanosterol en colesterol implica muchos pasos, no del todo comprendidos, y una serie de enzimas diferentes. En estos pasos se incluye (1) eliminación del grupo metilo en C-14, (2) eliminación de dos grupos metilo de C-4, (3) desplazamiento del doble enlace desde C-8 a C-5 y (4) reducción del doble enlace entre C-24 y C-25 en la cadena lateral (véase Figura 17.37).

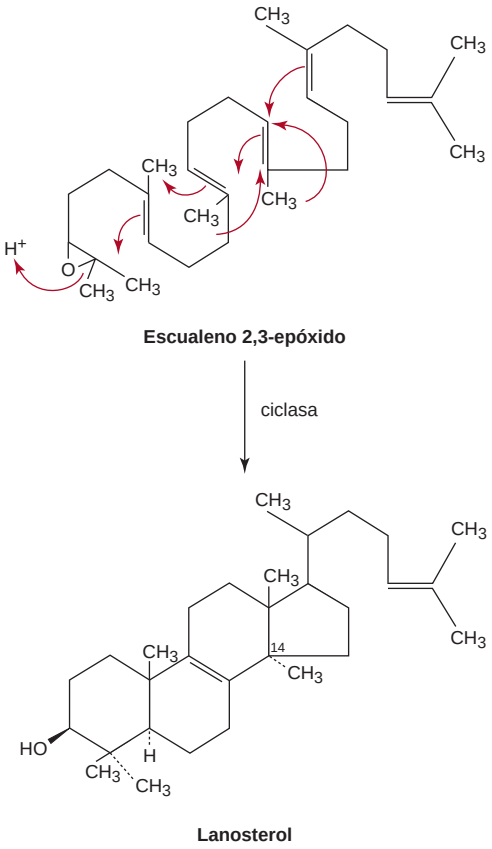


FIGURA 17.36
Transformación del escualeno 2,3-epóxido en lanosterol.

Lipoproteínas plasmáticas

La sangre contiene triacilgliceroles, colesterol y ésteres del colesterol a concentraciones que superan de mucho su solubilidad en agua. Los lípidos sanguíneos se mantienen en solución, o al menos muy dispersados en la circulación, gracias a que están incorporados a estructuras macromoleculares denominadas lipoproteínas. Las **lipoproteínas plasmáticas** facilitan el metabolismo lipídico y la transferencia de lípidos entre tejidos. Existen cuatro clases principales de lipoproteínas: **lipoproteínas de alta densidad (HDL)**(1,063-1,210 g/mL), **lipoproteínas de baja densidad**

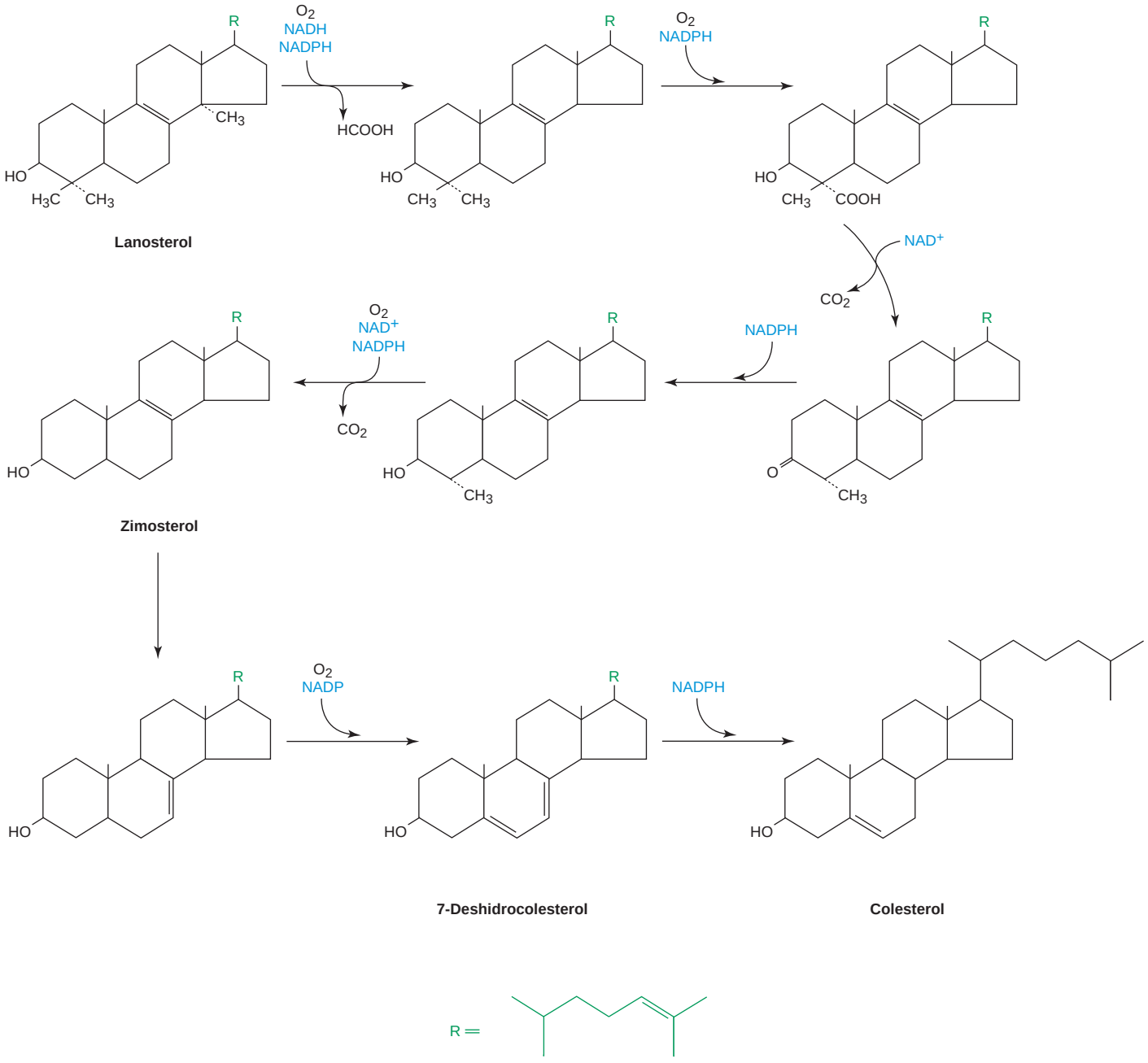


FIGURA 17.37
Conversión del lanosterol en colesterol.

(LDL)(1,019-1,063 g/mL), **lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL)**(0,95-1,006 g/mL) y **quilomicrones** (<0,95 g/mL). Sus composiciones lipídicas y proteicas se resumen en la Tabla 17.1. Todas las lipoproteínas plasmáticas contienen fosfolípidos y una o más proteínas denominadas apoproteínas. Hay diez apoproteínas corrientes; su denominación así como las lipoproteínas con las que están asociadas se indican en la Tabla 17.2. Existen subclases de apoproteínas (p. ej., apoC-I, apoC-II y apoC-III) y de lipoproteínas (p. ej., HDL_2, HDL_3).

Las lipoproteínas son partículas esféricas en las que los lípidos más hidrofóbicos tales como los ésteres del colesterol y los triacilgliceroles se encuentran en el núcleo de la estructura, secuestrados lejos del agua, mientras que el colesterol libre (no esterificado), los fosfolípidos y la(s) proteína(s) se encuentran en la superficie. Son principalmente los fosfolípidos anfipáticos y las proteínas las que mantienen en solución los que, de otro modo, son lípidos altamente insolubles tales como el co-

TABLA 17.1 Características y funciones de las principales lipoproteínas

Características	*Clases de lipoproteínas plasmáticas*					
	Quilomicrones	*VLDL*	*IDL*	*LDL*	*HDL_2*	*HDL_3*
Densidad (g mL^{-1})	<0,95	0,95–1,006	1,006–1,019	1,019–1,063	1,063–1,12	1,12–1,21
Diámetro (nm)	75–1200	30–80	15–35	18–25	10–20	7,5–10
Masa molecular	400×10^6	$(10–80) \times 10^6$	$(5–10) \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$(1,7–3,6) \times 10^6$	
Origen	Intestino	Hígado	VLDL	VLDL/IDL/hígado	Intestino e hígado	
Mobilidad electroforética	Origen	Pre-β	Pre-β a β	β	α	
Papel fisiológico	Transporte de grasa exógena	Transporte de grasa endógena	Precursor de LDL	Transporte de colesterol	Transporte de colesterol inverso	
Composición (%)						
Triacilglicerol	86	52	28	10	10	5
Ésteres de colesterol	3	14	30	38	21	14
Colesterol libre	1	7	8	8	7	3
Fosfolípido	8	18	23	22	29	19
Proteína	2	8	11	21	33	57

lesterol o los triacilgliceroles. Las apoproteínas de la superficie de la partícula también actúan como componentes estructurales, ligandos de receptores celulares y cofactores de enzimas implicados en el metabolismo lipoproteico.

Las lipoproteínas plasmáticas constituyen el vehículo mediante el cual se transportan el colesterol, los ésteres del colesterol y los triacilgliceroles de un tejido u órgano a otro en el cuerpo. Por ejemplo, la LDL lleva el colesterol a diversos tejidos que requieren colesterol para la estructura membranar o para la síntesis de hormonas esteroides. Además, el colesterol que transporta la LDL al hígado desde tejidos periféricos regula la velocidad de la síntesis hepática de colesterol (Figura 17.38). Por el contrario, la HDL, que es rica en colesterol y tiene un contenido de triacilgliceroles bajo (Tabla 17.1), constituye el vehículo principal para el transporte del exceso de colesterol desde la periferia al hígado en donde se puede excretar a través de la bilis ya sea directamente en forma de colesterol o después de su conversión en ácidos biliares. Las lipoproteínas, especialmente la VLDL y los quilomicrones, transportan triacilgliceroles a los sitios en los que son metabolizados para la producción de energía (p. ej., el músculo) o para su almacenamiento (p. ej., los adipocitos).

Una segunda función de las lipoproteínas plasmáticas es la de ser sustratos de enzimas sanguíneos del metabolismo lipídico. El enzima lipoproteína lipasa está unido al endotelio vascular en donde, cuando está activado, puede catalizar la hi-

TABLA 17.2 Apoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas humanas

Apolipoproteína	*Masa molecular*	*Concentración en plasma (g L^{-1})*	*Distribución en las lipoproteínas*
ApoA-I	28 000	1,0–1,2	Quilomicrones, HDL
ApoA-II	17 000	0,3–0,5	Quilomicrones, HDL
ApoA-IV	46 000	0,15–0,16	Quilomicrones, HDL
ApoB-48	264 000	0,03–0,05	Quilomicrones
ApoB-100	512 000	0,7–1,0	VLDL, IDL, LDL
ApoC-I	7000	0,04–0,06	Quilomicrones, VLDL, HDL
ApoC-II	9000	0,03–0,05	Quilomicrones, VLDL, HDL
ApoC-III	9000	0,12–0,14	Quilomicrones, VLDL, HDL
ApoD	33 000	0,06–0,07	HDL
ApoE	38 000	0,03–0,05	Quilomicrones, VLDL, IDL, HDL

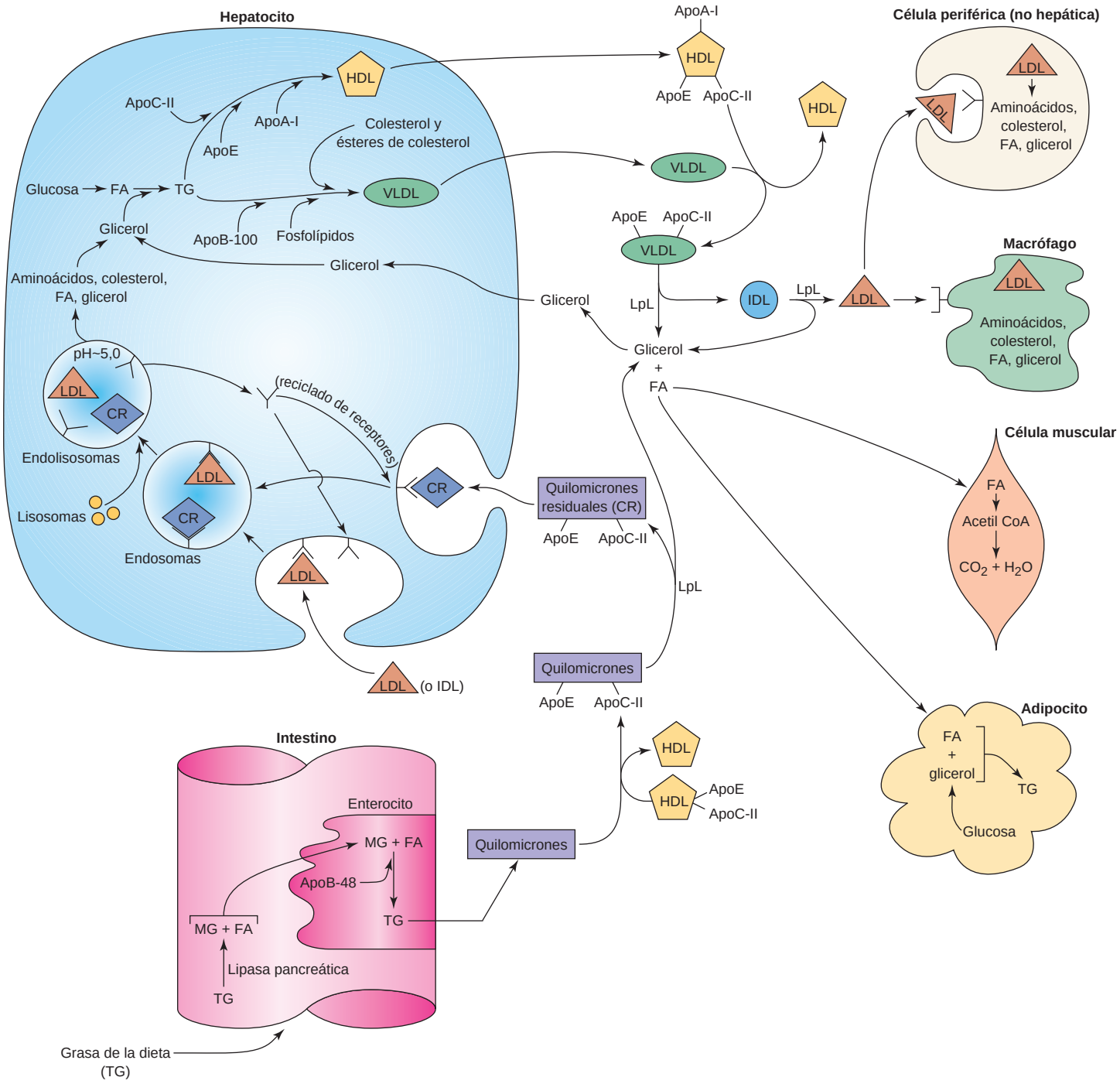


FIGURA 17.38

Órganos y rutas implicados en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas.

FA, ácido graso; TG, triacilglicerol (triglicérido); HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; VLDL, lipoproteína de densidad muy baja; LpL, lipoproteína lipasa; apo-, apoproteína; Y, receptor de LDL.

drólisis de triacilgliceroles contenidos en diversas partículas lipoproteicas, en especial VLDL y quilomicrones, suponiendo que estén presentes los activadores de la lipoproteína lipasa. La lipoproteína lipasa es activada por la **apolipoproteína C-II (apoC-II)** y por la heparina liberada de los mastocitos y de otros sitios dentro del sistema macrófago/retículo endotelial. Los ácidos grasos liberados por la acción esterolítica de la lipoproteína lipasa sobre los triacilgliceroles pueden ser captados por las células y oxidados a través de la vía de la β-oxidación para proporcionar energía, incorporados en fosfolípidos necesarios para las células en la construcción de membranas o, en el caso de los adipocitos, metabolizados a triacilgliceroles y almacenados en esta forma. A medida que los quilomicrones pierden su núcleo de

triacilgliceroles se hacen más pequeños; los quilomicrones desprovistos de triacilgliceroles se conocen como quilomicrones residuales, son ricos en ésteres de colesterol, se eliminan de la circulación mediante receptores específicos de las membranas hepáticas y se catabolizan en el hígado (Figura 17.38). Se puede apreciar claramente, a la vista de estos diversos ejemplos de la función de las lipoproteínas, el carácter dinámico de la estructura y función de las lipoproteínas plasmáticas.

Los sitios principales de síntesis de los componentes de apoproteína de las lipoproteínas plasmáticas son el hígado y el intestino delgado. Por ejemplo, la **apoB-48** se produce en el intestino mientras que la apoB-100 se sintetiza principalmente en los hepatocitos. Así la apoB-48 se sintetiza en el transcurso de la digestión de grasas en el intestino delgado y entra en la circulación cuando los quilomicrones portadores de triacilgliceroles y ésteres del colesterol se secretan a la sangre después del consumo de una comida que contenga grasa. Por el contrario, la apoB-100 se sintetiza cuando el hígado está produciendo VLDL para su secreción a la circulación. Los ácidos grasos presentes en los triacilgliceroles de partículas de VLDL recién producidas son sintetizados *de novo* a partir de azúcares, especialmente glucosa, después que estos hayan sido oxidados a acetil CoA, o a partir del acetato resultante de la oxidación de etanol. La VLDL circulante adquiere los ésteres de colesterol durante la síntesis y transporte en el hígado así como de la HDL plasmática. La transferencia de ésteres de colesterol desde la HDL a la VLDL está facilitada por la **proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP)**, la cual también transfiere ésteres del colesterol a la LDL.

Mientras que la VLDL y los quilomicrones son producidos y secretados por células específicas las restantes lipoproteínas mayoritarias surgen del metabolismo de estas dos lipoproteínas en la circulación. La acción de la lipoproteína lipasa sobre la VLDL convierte a esta última primeramente en la **lipoproteína de densidad intermedia (IDL)** y, a continuación, a medida que triacilgliceroles adicionales son sometidos a lipólisis, en LDL (Figura 17.38).

La HDL se sintetiza principalmente en el hígado y, en menor cantidad, en el intestino y tiene la función específica de actuar de reserva para la **apoE** y la **apoC-II.** La HDL regula el intercambio de proteínas y lípidos entre diversas lipoproteínas en la sangre. Inicialmente, las partículas de HDL donan apoE y apoC-II a los quilomicrones y a la VLDL con lo que proporcionan activadores de la lipoproteína lipasa.Una vez que los triacilgliceroles de los quilomicrones y de la VLDL se han degradado de forma extensiva y estas lipoproteínas se han transformado en LDL y quilomicrones residuales, respectivamente, las proteínas apoE y apoC-II vuelven a la HDL (Figura 17.38).

Otra función crítica de la HDL es su participación en la eliminación del exceso de colesterol en células y el transporte de este colesterol, potencialmente dañino, al hígado para ser eliminado del cuerpo vía sistema biliar y heces en forma de colesterol y ácidos biliares. Este proceso se denomina "**transporte inverso de colesterol**". Entre el 70 y 75% del colesterol plasmático contenido en lipoproteínas está esterificado con ácidos grasos de cadena larga. Es la forma libre, no esterificada, del colesterol la que se intercambia fácilmente entre diferentes lipoproteínas y la membrana plasmática de las células. El colesterol de la membrana plasmática celular y el de las lipoproteínas plasmáticas destinado para su transporte al hígado se esterifican a un ácido graso mediante una reacción catalizada por el enzima **lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT)**. La LCAT cataliza la reacción, completamente reversible (Figura 17.39), que transfiere el ácido graso en la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina al 3-hidroxilo del colesterol y viceversa. La LCAT se produce prin-

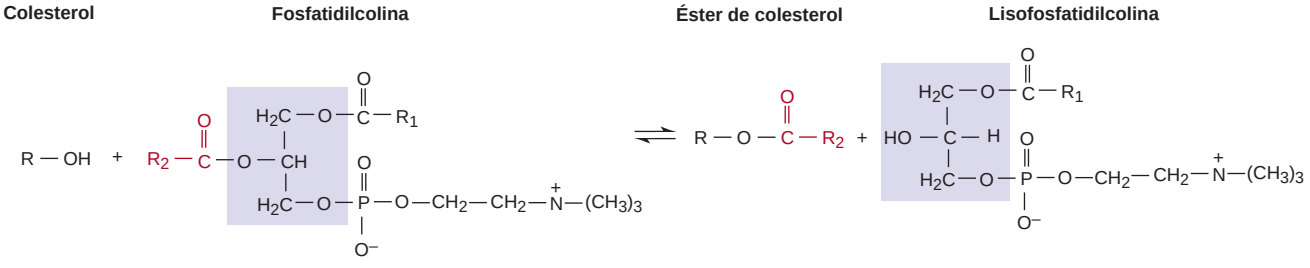


FIGURA 17.39
Reacción de la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), en donde R—OH indica colesterol.

cipalmente en el hígado. La LCAT está unida a la HDL en el plasma y es activada por la apoA-1, la cual es también un componente de la HDL. A continuación la CETP que está asociada con la partícula de HDL transfiere el éster del colesterol a la VLDL o a la LDL. El éster de colesterol generado en la reacción de la LCAT difunde al núcleo de la partícula de HDL y es transportado, a continuación, desde los tejidos y plasma al hígado, único órgano capaz de metabolizar y excretar el colesterol. Existe una relación inversa entre las concentraciones de HDL en plasma y la incidencia de enfermedad de las arterias coronarias y una relación directa entre niveles de colesterol plasmático y enfermedad coronaria cardíaca.

Las células hepáticas metabolizan los quilomicrones residuales mediante un mecanismo similar; no obstante, los macrófagos y muchas otras clases de células poseen receptores específicos que reconocen los quilomicrones residuales internalizándolos y degradándolos para utilizarlos como combustible celular y componentes estructurales. Estos receptores especiales reconocen el componente apoE de los quilomicrones residuales. Una parte de la LDL es captada mediante receptores no específicos que se encuentran en ciertas células, especialmente macrófagos.

La biosíntesis del colesterol está finamente regulada

Un colesterol plasmático elevado predispone para la enfermedad aterosclerótica vascular. En los individuos sanos, los niveles de colesterol plasmático se mantiene dentro de unos límites de concentración relativamente estrechos. El hígado juega el papel principal en la regulación de los niveles de colesterol: (1) expresa la mayoría de los receptores de LDL corporales; (2) es el sitio principal de la conversión del colesterol en ácidos biliares y (3) tiene el nivel más elevado de actividad HMG-CoA reductasa. La reserva de colesterol corporal proviene de la absorción del colesterol de la dieta, y de la síntesis *de novo*, principalmente en el hígado y en el intestino. Cuando se reduce la cantidad de colesterol en la dieta, se incrementa la síntesis de colesterol en el hígado y en el intestino para satisfacer las necesidades de los restantes órganos y tejidos. El colesterol sintetizado *de novo* es transportado desde el hígado y el intestino a los tejidos periféricos mediante las VLDL y los quilomicrones, respectivamente. Estos dos tejidos son los únicos capaces de producir **apolipoproteína B-100** y **B-48**. La mayor parte de la apolipoproteína B-100 se secreta a la circulación en forma de VLDL, que se convierte en LDL al eliminarse los componentes triacilgliceroles y la apolipoproteína C, operación que probablemente tiene lugar en los tejidos periféricos y en el hígado. Cuando aumenta la cantidad de colesterol de la dieta, se suprime casi totalmente la síntesis de colesterol en el hígado y en el intestino. Así, la velocidad de síntesis *de novo* de colesterol está en relación inversa a la cantidad de colesterol que el cuerpo ingiere por la alimentación.

El punto primario para el control de la biosíntesis de colesterol es la HMG-CoA reductasa, que cataliza el paso que produce ácido mevalónico. Éste es el paso comprometido, y a la vez, la reacción limitante de la velocidad en la ruta de la biosín-

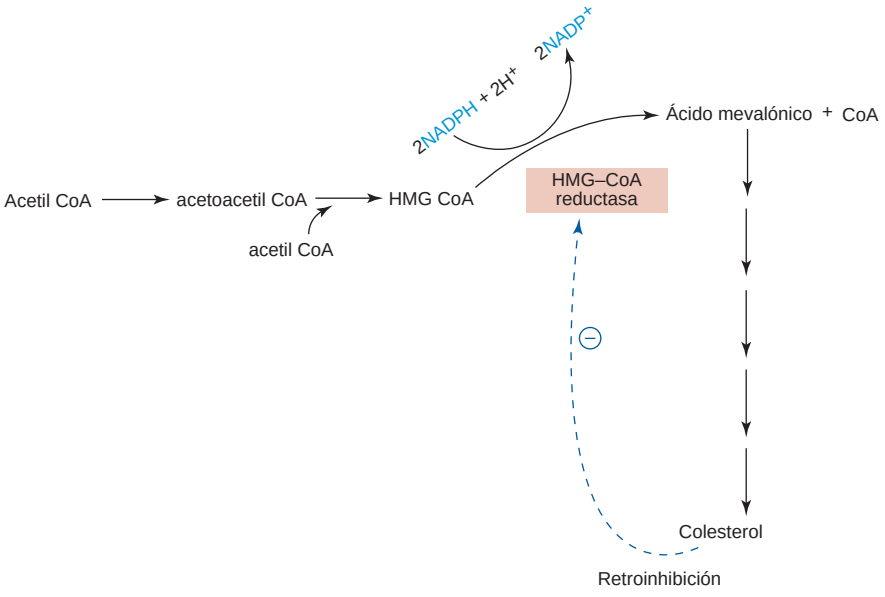


FIGURA 17.40
Resumen de la síntesis del colesterol en la que se indica la retroinhibición de la HMG-CoA reductasa por el colesterol.

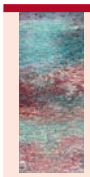
tesis del colesterol (Figura 17.40). El colesterol efectúa una **retroinhibición** de su propia síntesis inhibiendo la actividad de la HMG-CoA reductasa preexistente, y también promoviendo la rápida inactivación del enzima por mecanismos que aún no se han elucidado.

En un adulto normal sano con una dieta pobre en colesterol, se devuelven al hígado unos 1300 mg de colesterol diarios para su eliminación. Este colesterol proviene del colesterol reabsorbido del intestino mediante la circulación enterohepática y de la HDL que transporta colesterol al hígado desde los tejidos periféricos. El hígado elimina el colesterol de tres maneras: (1) excreción en la bilis en forma de colesterol libre, y después de su conversión a ácidos biliares; cada día se pierden unos 250 mg de sales biliares y 550 mg de colesterol de la circulación enterohepática, (2) esterificación y almacenamiento en el hígado en forma de ésteres de colesterol y (3) incorporación a lipoproteínas (VLDL y LDL), seguida de secreción a la circulación. Con una dieta pobre en colesterol, el hígado sintetiza unos 800 mg de colesterol por día para reemplazar las sales biliares y el colesterol perdidos de la circulación enterohepática por las heces.

El mecanismo de supresión de la síntesis del colesterol por el colesterol ligado a la LDL implica la actuación de **receptores de LDL** específicos en la superficie de la membrana plasmática. Alrededor del 75% del catabolismo de la LDL tiene lugar en el hígado a través de este proceso en el que intervienen receptores de LDL. El primer paso del mecanismo regulador implica la fijación de lipoproteína LDL a estos receptores de LDL, extrayéndose así las partículas de LDL del plasma. La reacción de fijación se caracteriza por su saturabilidad, alta afinidad y alto grado de especificidad. El receptor sólo reconoce LDL y VLDL, las dos lipoproteínas plasmáticas que contienen **apolipoproteína E (apoE)** y apolipoproteína B-100 (apoB-100). La unión a receptores tiene lugar en sitios de la membrana plasmática que poseen cavidades recubiertas de una proteína llamada **clatrina**, la lipoproteína cargada de colesterol sufre la endocitosis en forma de vesículas recubiertas de clatrina. Este proceso se denomina **endocitosis dirigida por receptor**. En el interior de las células, las vesículas recubiertas pierden su clatrina y se convierten en endosomas (Figura 17.38). Este proceso se llama **endocitosis mediante receptor**. El paso siguiente supone la fusión del endosoma con un lisosoma que contiene abundantes enzimas hidrolíticos, entre ellos proteasas y colesterol esterasa. En el ambiente relativamente ácido (aprox. pH 5,0) producido por la fusión del endosoma con el lisosoma el receptor de LDL se separa de la LDL y regresa a la superficie celular. Dentro del lisosoma, los ésteres de colesterol de la LDL son hidrolizados por la colesterol esterasa, produciendo colesterol libre y una molécula de ácido graso de cadena larga. Los componentes proteicos de la partícula residual de LDL experimentan proteólisis por las proteasas lisosómicas con lo que los aminoácidos libres entran en el fondo de aminoácidos celular. A continuación, el colesterol libre difunde al citosol, en donde inhibe la actividad de la HMG-CoA reductasa mediante algún mecanismo todavía desconocido y suprime la síntesis del enzima HMG-CoA reductasa. Existen pruebas de que el colesterol actúa a nivel del DNA y de la síntesis de proteínas reduciendo la velocidad de síntesis de la HMG-CoA reductasa. Al mismo tiempo, la **acil graso-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT)** del retículo endoplasmático es activada por el colesterol, lo cual promueve la formación de ésteres del colesterol, principalmente oleato de colesterol. La acumulación de colesterol intracelular inhibe finalmente la reposición de receptores de LDL de la superficie celular, fenómeno denominado "down regulation" (regulación por disminución del número de receptores), con lo que queda bloqueada la posterior captación y acumulación de colesterol.

El receptor de LDL es una glucoproteína monocatenaria. Numerosas mutaciones en su gen están asociadas con la hipercolesterolemia familiar. El receptor atraviesa la membrana plasmática una sola vez, situándose su extremo carboxilo en la cara citoplasmática, mientras que el extremo amino, que contiene el sitio de unión de LDL, se halla en el espacio extracelular. La apoproteína B-100 y la apoproteína E, que está presente en las IDL (las lipoproteínas de densidad intermedia) y en algunas formas de HDL, son las dos proteínas a través de las cuales determinadas lipoproteínas se unen al receptor de LDL.

La correlación que existe entre altas concentraciones de colesterol en plasma, especialmente el colesterol en las LDL, y los ataques al corazón y la apoplejía, ha llevado al desarrollo de tratamientos dietéticos y terapéuticos para reducir la cantidad de colesterol presente en la sangre (Apli. Clín. 17.2). Los pacientes con hipercolesterolemia familiar (genética) padecen aterosclerosis acelerada (Apli. Clín. 17.3). En la

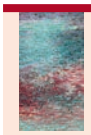


APLICACIÓN CLÍNICA 17.2

Tratamiento de la hipercolesterolemia

Un gran número de autoridades médicas recomiendan que se estudie a los individuos asintomáticos mediante la medición de su colesterol en el plasma. Un nivel inferior a 200 mg% se considera deseable, pero un nivel que supere los 240 mg% requiere un análisis lipoproteico y, especialmente, la determinación del colesterol en las LDL. La reducción de éste depende de la restricción de colesterol en la dieta hasta cantidades inferiores a 300 mg por día, así como de la disminución de la ingestión de calorías hasta alcanzar el peso ideal, sin olvidar que las grasas deben representar menos de un 30% de las calorías totales. Aproximadamente dos terceras partes de las grasas deben ser mono- o poliinsaturadas. La segunda parte de la terapia está relacionada con los fármacos. La colestiramina y el colestipol son fármacos que se unen con las sales biliares y que favorecen la excreción de éstas. A su vez, este hecho aumenta la velocidad a la que se sintetizan las sales biliares hepáticas, e incrementa la absorción de LDL por parte del hígado. La lovastatina es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. Como este enzima limita la síntesis de colesterol, la lovastatina disminuye la síntesis endógena del colesterol y estimula tanto la absorción de éste como de las LDL a través del receptor de estas últimas. En ocasiones, se utiliza una combinación de lovastatina y colestiramina para tratar las hiperlipidemias graves.

Expert Panel. Evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *Arch. Intern. Med.* 148:36, 1988.



APLICACIÓN CLÍNICA 17.3
Aterosclerosis

La aterosclerosis es la primera causa de mortalidad en los países occidentales industrializados. El riesgo de desarrollarla es directamente proporcional a la concentración plasmática de LDL-colesterol e inversamente proporcional a la de HDL-colesterol. Esto explica la causa de que al primero se le llama frecuentemente colesterol "malo" y al segundo colesterol "bueno", aunque químicamente existe un único colesterol. La aterosclerosis es un trastorno de la pared arterial caracterizado por la acumulación de ésteres de colesterol en las células, procedentes de la línea monocitomacrófaga, por la proliferación de células del músculo liso, y por fibrosis. La primera anormalidad es la migración de los monocitos sanguíneos hacia el subendotelio de la arteria. Una vez allí, éstos se convierten en macrófagos y acumulan ésteres de colesterol procedentes de las LDL plasmáticas. Aún se desconoce la razón por la que estas células no regulan con normalidad las reservas de colesterol celular. Quizás una parte de las LDL se absorba a través de rutas diferentes de la clásica ruta de los receptores de LDL. Por ejemplo, se han descrito receptores que intervienen en la absorción de LDL acetiladas o conjugadas con dextrán sulfato, y se ha descubierto que éstos no se regulan mediante el contenido de colesterol celular. La distorsión del subendotelio provoca una agregación de plaquetas en la superficie endotelial, con lo que se liberan mitógenos procedentes de plaquetas tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Se cree que éste, a su vez, estimula el crecimiento celular del músculo liso. La muerte de las células alveolares (esponjosas) tiene como resultado la acumulación de un lípido celular que puede estimular la fibrosis. Aparece entonces una placa aterosclerótica que estrecha los vasos sanguíneos y que sirve como lugar de formación de los trombos, causantes de los infartos de miocardio (ataques al corazón).

Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *N. Engl. J. Med.* 314:488, 1986.

mayoría de los casos existe una falta de receptores de LDL funcionales en la superficie celular debido a que los alelos mutantes producen muy poca, o no producen, proteína receptora de LDL. Estos pacientes reciben el nombre de receptor-negativos. En otros casos, el receptor de LDL se sintetiza y se transporta normalmente hasta la superficie celular; sin embargo, la sustitución de un aminoácido u otro tipo de alteración en la estructura proteica primaria, afecta negativamente a la región de unión a LDL del receptor. Como resultado de ello, hay muy poca o nula fijación de LDL a la célula, el colesterol no se transfiere al interior de la misma, y la síntesis de colesterol no se inhibe, por lo que el contenido de colesterol en la sangre aumenta. Otros enfermos de hipercolesterolemia que presentan una deficiencia de LDL son capaces de sintetizar el receptor de LDL, pero tienen un defecto en el mecanismo de transporte que lleva a la glucoproteína hasta su posición correcta en la membrana plasmática. Por último, existe otro subgrupo de hipercolesterolémicos determinados genéticamente cuyos receptores de LDL poseen un defecto en el extremo carboxilo citoplasmático. Por lo general, distribuyen los receptores de LDL por la superficie celular de forma correcta, pero no consiguen internalizar el complejo receptor de LDL–LDL a causa de su incapacidad para introducir dicho complejo en las cavidades recubiertas.

En tejidos especializados tales como la glándula adrenal y los ovarios, el colesterol proveniente de las LDL actúa como precursor de las hormonas esteroideas tales como el cortisol y estradiol, respectivamente. En el hígado, el colesterol extraído de las LDL y HDL se convierte en sales biliares que intervienen en la digestión intestinal de las grasas.

El colesterol se excreta principalmente en forma de ácidos biliares

Los ácidos biliares son los productos finales del metabolismo del colesterol. Los ácidos biliares primarios se sintetizan en los hepatocitos directamente del colesterol. Los ácidos biliares más abundantes en el hombre son los derivados del ácido colánico (Figura 17.41), esto es, el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico (Figura 17.42). Los ácidos biliares primarios son compuestos de 24 átomos de carbono, contienen dos o tres grupos hidroxilo, y tienen una cadena lateral que finaliza con un grupo carboxilo que está ionizado a pH 7,0 (de aquí el nombre de sal biliar). El grupo carboxilo de los ácidos biliares primarios está a menudo conjugado mediante un enlace amida con la glicina ($NH_2—CH_2—COOH$), o con la taurina ($NH_2—CH_2—CH_2—SO_3H$), formando así ácido glicocólico o taurocólico, respectivamente. La estructura del ácido glicocólico se muestra en la Figura 17.43.

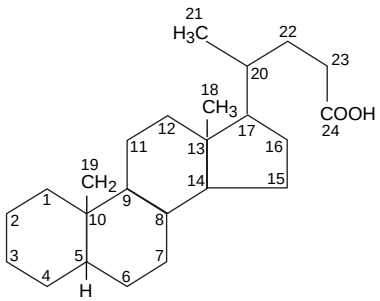


FIGURA 17.41
Estructura del ácido colánico.

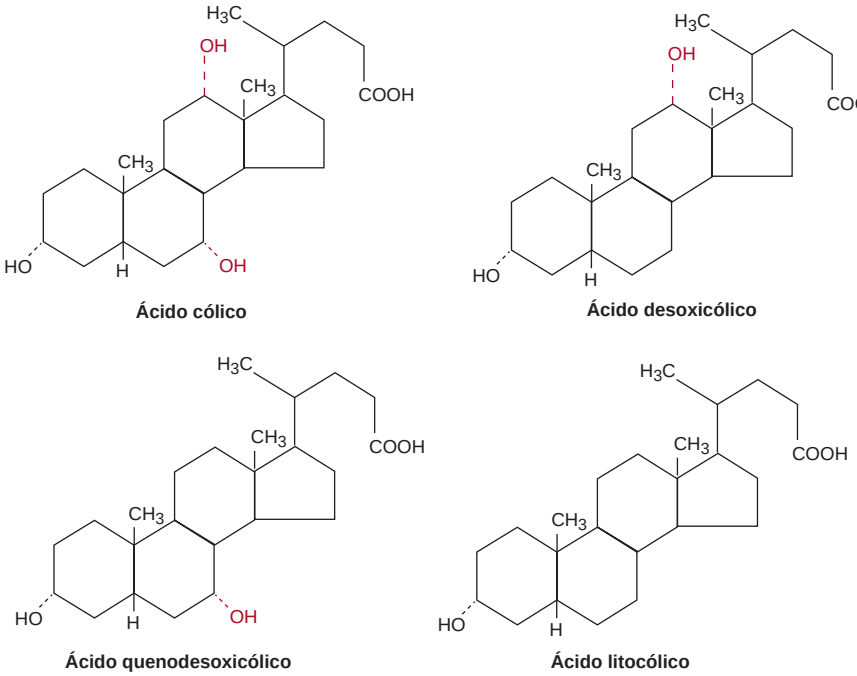


FIGURA 17.42
Estructura de algunos ácidos biliares comunes.

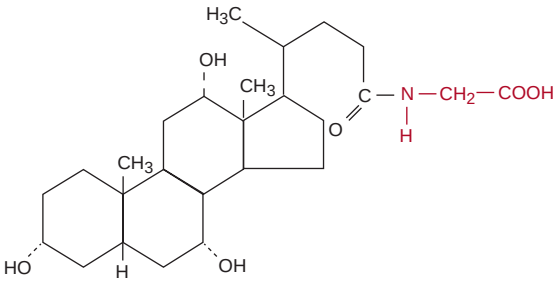


FIGURA 17.43
Estructura del ácido glicólico, un ácido biliar conjugado.

Cuando experimentan reacciones químicas por microorganismos del intestino, los ácidos biliares primarios dan lugar a ácidos biliares secundarios que también poseen 24 átomos de carbono. Los ácidos desoxicólico y litocólico constituyen ejemplos de ácidos biliares secundarios, y provienen, respectivamente, de los ácidos cólico y quenodesoxicólico por eliminación de un grupo hidroxilo (Figura 17.42). La transformación del colesterol en ácidos biliares requiere (1) epimerización del grupo 3β-OH; (2) reducción del doble enlace en C-5; (3) introducción de grupos OH en C-7 **(ácido quenodesoxicólico)** o en C-7 y C-12 **(ácido cólico)**; y (4) conversión de la cadena lateral C-27 en un ácido carboxílico C-24 por eliminación de un equivalente de propilo.

Los ácidos biliares se secretan a los canalículos biliares, que son canales especializados formados por hepatocitos contiguos. Los canalículos biliares se unen formando los conductos biliares. Los ácidos biliares se transportan a la vesícula biliar para su almacenamiento y, en último término, al intestino delgado, en donde son excretados. La capacidad de producción de ácidos biliares por el hígado es insuficiente para sus demandas fisiológicas, por lo que el cuerpo depende de una **circulación enterohepática** eficiente que transporta los ácidos biliares desde el intestino al hígado varias veces al día. Después de desprenderse del residuo de glicina o de taurina en el intestino, los ácidos biliares primarios son reabsorbidos por un proceso de transporte activo desde el intestino, principalmente en el íleon, para ser devueltos al hígado por medio de la vena porta. Los ácidos biliares que no son reabsorbidos sufren la acción de las bacterias en el intestino, convirtiéndose así en ácidos biliares secundarios; una parte de los ácidos biliares secundarios, principalmente los ácidos desoxicólico y litocólico, son reabsorbidos pasivamente en el colon y devueltos al hígado, en donde son secretados a la vesícula biliar. La síntesis hepática produce normalmente 0,2 a 0,6 g de ácidos biliares diariamente para reemplazar los que se pierden en las heces. La reserva de ácidos biliares de la vesícula biliar es de 2 a 4 g. Dado que la circulación enterohepática recicla entre 6 y 12 veces diarias, la cantidad total de ácidos biliares absorbidos diariamente desde el intestino corresponde a unos 12 a 32 g.

Los ácidos biliares son importantes en medicina por diversas razones. Representan la única vía significativa por la que se puede excretar el colesterol. El esqueleto carbonado del colesterol no se oxida a CO_2 y agua en el ser humano, sino que se excreta en la bilis en forma de colesterol libre y de ácidos biliares. Los ácidos biliares impiden la precipitación del colesterol en la vesícula biliar. Los ácidos biliares y los fosfolípidos actúan solubilizando el colesterol en la bilis y actúan como agentes emulsionantes preparando los triacilgliceroles de la dieta para el ataque por la lipasa pancreática. Los ácidos biliares juegan un papel directo en el control de la lipasa pancreática (véase p. 1105) y facilitan la absorción de las vitaminas liposolubles, especialmente la vitamina D, del intestino.

La vitamina D se sintetiza a partir de un intermediario de la ruta biosintética del colesterol

La biosíntesis del colesterol proporciona un sustrato para la producción fotoquímica en la piel de la vitamina D_3. El metabolismo y la función de la vitamina D_3 se estudian en la p. 1141. La **vitamina D_3** es un secosteroide en el que el enlace 9,10 del anillo B del colesterol ha experimentado una fisión (Figura 17.44). El suministro más importante de vitamina D_3 es el que se sintetiza en la piel. El **7-deshidrocolesterol** es un intermediario en la ruta de la biosíntesis del colesterol que se convierte en la piel en provitamina D_3, gracias a la radiación ultravioleta del sol (285–310 nm). La provitamina D_3 es biológicamente inerte y lábil, y se convierte lentamente (~36 h) por el calor y mediante una reacción no enzimática en el isómero de doble enlace, que es la vitamina activa biológicamente, el **colecalciferol**

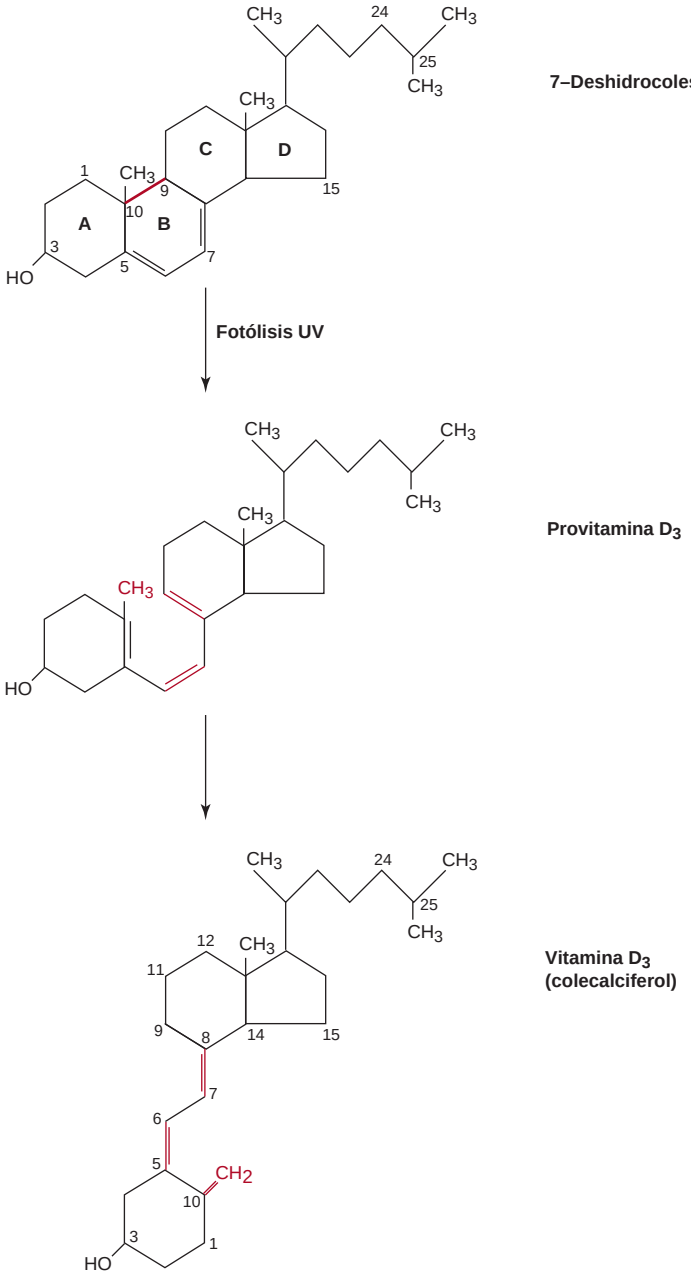
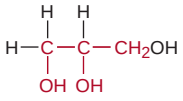


FIGURA 17.44
Conversión fotoquímica del 7-deshidrocolesterol en vitamina D_3 (colecalciferol).



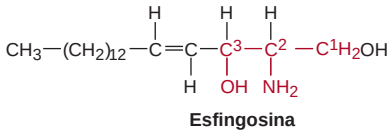


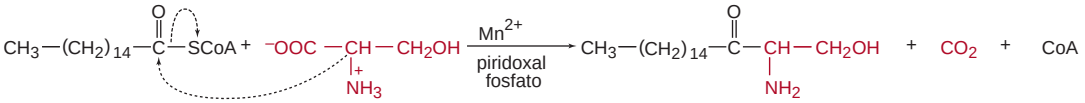
FIGURA 17.45
Comparación de las estructuras del glicerol y de la esfingosina (*trans*-1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno).

(vitamina D_3). Una exposición diaria al sol de las manos y de la cara durante sólo10 minutos basta para satisfacer las necesidades corporales de vitamina D. Asimismo, la acción fotoquímica sobre un esterol de las plantas, el ergosterol, también proporciona un precursor dietético de la vitamina **D_2** (**calciferol**), que puede proporcionar la vitamina D que el cuerpo necesita.

17.4 | ESFINGOLÍPIDOS

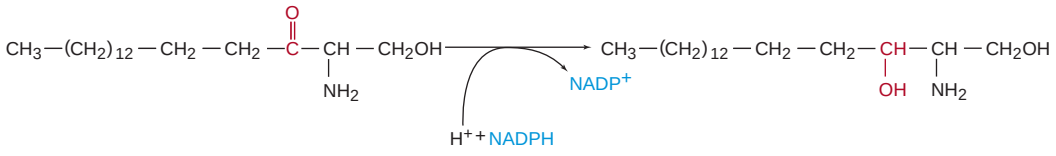
Biosíntesis de la esfingosina

Los esfingolípidos son lípidos complejos cuya estructura central es proporcionada por el aminoalcohol de cadena larga **esfingosina** (Figura 17.45) (4-esfingenina; o *trans*-1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno). La esfingosina posee dos átomos de carbono asimétricos (posiciones C-2 y C-3); de los cuatro isómeros ópticos posi-



Palmitil CoA — L-Serina — 3-Cetodihidroesfingosina

FIGURA 17.46
Formación de la 3-cetodihidroesfingosina a partir de la serina y del palmitil CoA.



3-Cetodihidroesfingosina — Esfinganina (dihidroesfingosina)

FIGURA 17.47
Conversión de la 3-cetodihidroesfingosina en esfinganina.

bles, la esfingosina que se encuentra en la naturaleza es la forma D-eritro; el doble enlace de la esfingosina tiene la configuración trans. El grupo alcohol primario en C-1 es un centro nucleofílico que forma enlaces covalentes con azúcares para formar glucoesfingolípidos. Cuando forma una ceramida el grupo amino en C-2 lleva siempre un ácido graso de cadena larga (normalmente C_{20}–C_{26}) formando enlace amida; y el alcohol secundario en C-3 está siempre libre. Es útil observar la semejanza estructural de una parte de la molécula de esfingosina con la porción glicerol de los acilgliceroles (Figura 17.45).

Los esfingolípidos se encuentran en la sangre y en casi todos los tejidos del cuerpo. Las concentraciones más elevadas se encuentran en la sustancia blanca del sistema nervioso central. Diversos esfingolípidos son componentes de la membrana plasmática de prácticamente todas las células.

La esfingosina se sintetiza a través de la **esfinganina (dihidroesfingosina)** a partir de los precursores serina y palmitil CoA. La serina es la fuente de C-1 y C-2 y del grupo amino de la esfingosina, mientras que el ácido palmítico suministra los restantes átomos de carbono. La condensación de la serina con el palmitil CoA está catalizada por la **serina-palmitil transferasa**, enzima dependiente del piridoxal fosfato, y la fuerza motriz de la reacción es la rotura del enlace tioéster del palmitil CoA, que es reactivo y de alta energía, así como la liberación de CO_2 de la serina (Figura 17.46). La reducción del grupo carbonilo de la 3-cetodihidroesfingosina requiere NADPH para producir la esfinganina (Figura 17.47). La inserción de doble enlace en la esfinganina para producir la esfingosina tiene lugar a nivel de ceramida (véase más adelante).

Las ceramidas son derivados amídicos de ácidos grasos que provienen de la esfingosina

La esfingosina como tal no se encuentra en la naturaleza. El bloque estructural fundamental de los esfingolípidos naturales es la **ceramida**, un derivado amídico de la esfingosina con un ácido graso de cadena larga. Este último está unido al grupo 2-amino de la esfingosina a través de un enlace amida (Figura 17.48). Muy a menudo, el grupo acilo es el **ácido behénico**, un ácido graso saturado de C_{22}, si bien también pueden utilizarse otros ácidos grasos de cadena larga. Hay dos dominios hidrocarbonados de cadena larga en la molécula de ceramida; estas regiones hidrofóbicas son responsables del carácter lipídico de los esfingolípidos.

La ceramida se sintetiza a partir de la dihidroesfingosina y una molécula de acil CoA graso de cadena larga, en una reacción catalizada por un enzima del retículo endoplasmático con la dihidroceramida como intermediario, la cual se oxida a continuación por deshidrogenación en los carbonos 4 y 5 (Figura 17.49). La ceramida no es un componente de los lípidos de membrana, sino que es un intermediario en la síntesis y catabolismo de los glucoesfingolípidos y de la esfingomielina. La Figura 17.50 contiene, en forma diagramática, las estructuras de los principales esfingolípidos humanos.

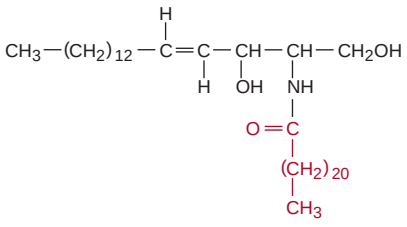


FIGURA 17.48
Estructura de una ceramida (*N*-acil-esfingosina).

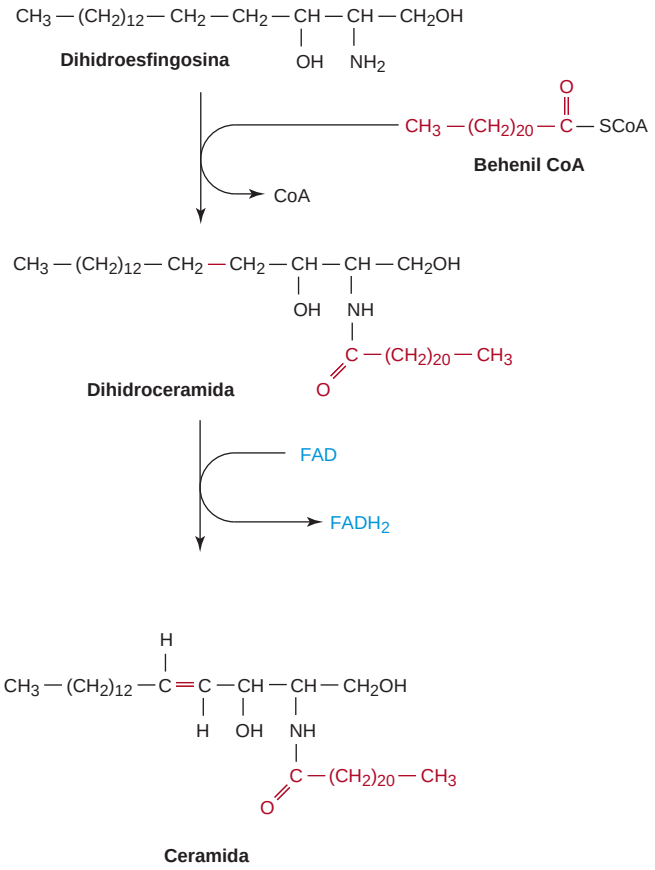


FIGURA 17.49
Formación de ceramida a partir de dihidroesfingosina.

La esfingomielina es el único esfingolípido que contiene fósforo

La **esfingomielina** es uno de los principales componentes de las membranas del tejido nervioso. Es el único esfingolípido que es fosfolípido. En la esfingomielina, el grupo alcohol primario en C-1 de la esfingosina está esterificado con la colina a través de un enlace fosfodiéster del tipo que se encuentra en los acilglicerofosfolípidos, y el grupo amino de la esfingosina está unido a un ácido graso de cadena larga mediante un enlace amida. La esfingomielina es, por tanto, una ceramida-fosfocolina que contiene una carga positiva y una negativa, por lo que es un compuesto neutro a pH fisiológico (Figura 17.51). Los ácidos grasos más comunes en la esfingomielina son el palmítico (16:0), esteárico (18:0), lignocérico (24:0) y nervónico (24:1). La esfingomielina de la mielina contiene predominantemente ácidos grasos de cadenas más largas, principalmente lignocérico y nervónico, mientras que la de la sustancia gris contiene mayoritariamente ácido esteárico. En la enfermedad de Niemann–Pick, se producen acumulaciones excesivas de esfingomielina.

La esfingomielina se sintetiza a partir de una ceramida y de fosfatidilcolina

La transformación de la ceramida en esfingomielina implica la transferencia de un grupo fosfocolina de la fosfatidilcolina (lecitina). La **esfingomielina sintasa** (Figura 17.52) cataliza esta reacción.

Los glucoesfingolípidos contienen normalmente una unidad de galactosa o de glucosa

Las principales clases de glucoesfingolípidos son los cerebrósidos, sulfátidos, globósidos y gangliósidos. En los glucolípidos, la cabeza polar está unida a la esfingosina mediante enlace glucosídico con una molécula de azúcar, en lugar de estarlo mediante un enlace éster fosfato, tal como ocurre con los fosfolípidos.

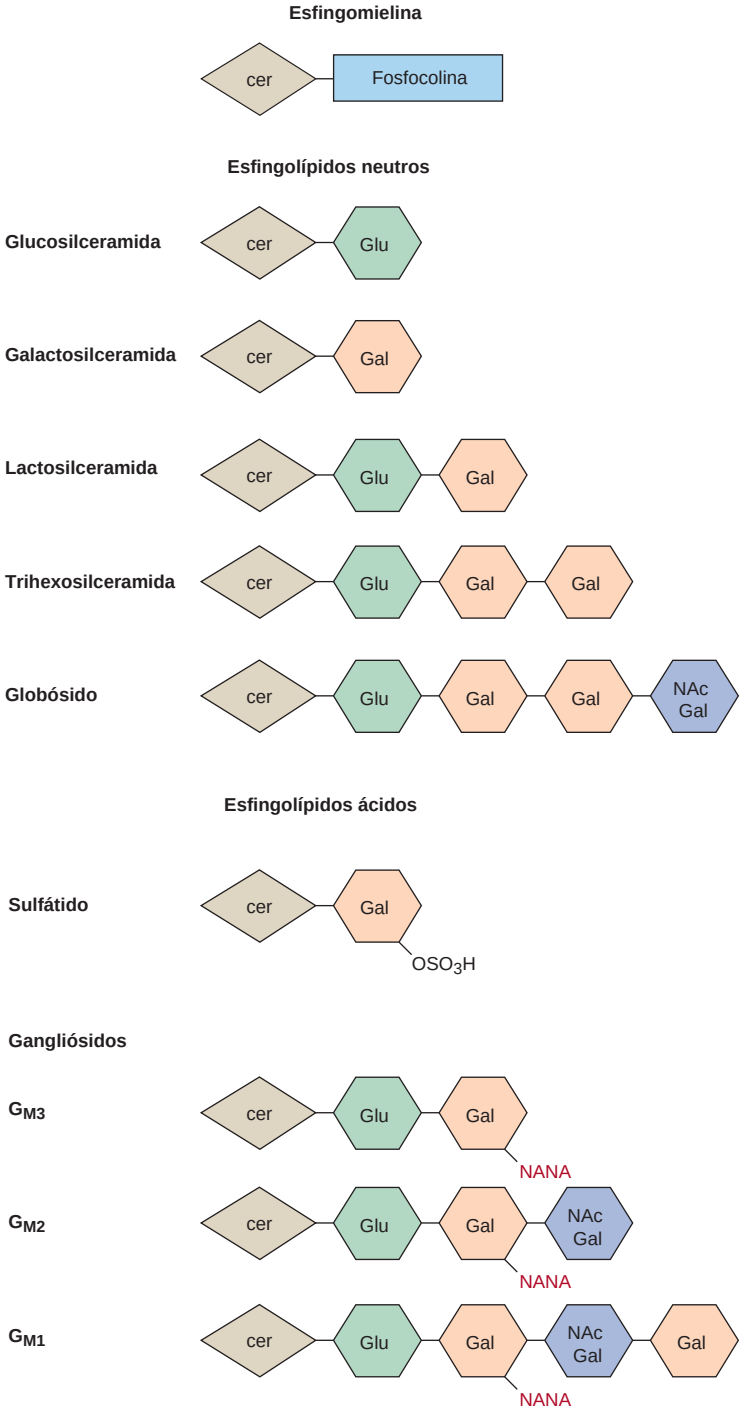


FIGURA 17.50
Estructuras esquemáticas de algunos de los esfingolípidos comunes.
Cer, ceramida; Glu, glucosa; Gal, galactosa; NAcGal, N-acetilgalactosamina; y NANA, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico).

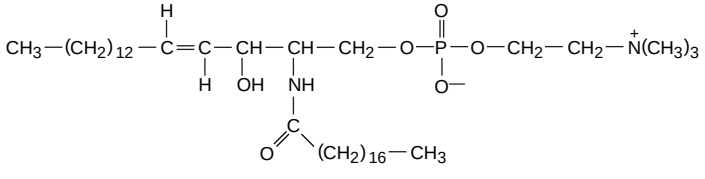


FIGURA 17.51
Estructura de la esfingomielina.

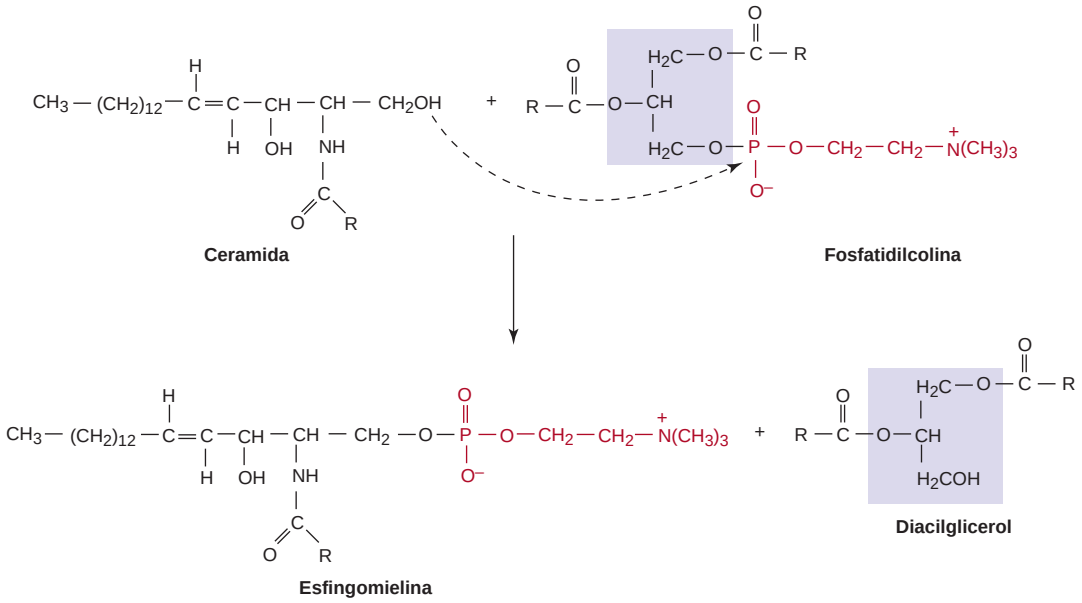


FIGURA 17.52
Síntesis de la esfingomielina a partir de ceramida y fosfatidilcolina.

Los cerebrósidos son glucosilceramidas

Los **cerebrósidos** son un grupo de ceramidas monohexósido. Los dos cerebrósidos más comunes son el **galactocerebrósido** y el **glucocerebrósido**. A menos que se especifique lo contrario, el término cerebrósido se refiere normalmente al galactocerebrósido, también llamado "**galactolípido**". Nótese que en la Figura 17.53 las unidades monosacáridas están unidas por el C-1 de la porción de azúcar a la posición C-1 de la ceramida, y que la configuración anomérica del enlace glucosídico entre la ceramida y la hexosa, tanto en el galactocerebrósido como en el glucocerebrósido, es β. La mayor cantidad de galactocerebrósido se encuentra, en personas sanas, en el cerebro. En la enfermedad de Krabbe, también denominada leucodistrofia globoide, se acumulan cantidades moderadamente incrementadas de galactocerebrósido en la sustancia blanca, debido a una deficiencia del enzima lisosómico galactocerebrosidasa.

El glucocerebrósido (glucosilceramida) no es, normalmente, un componente estructural de las membranas, sino un intermediario de la síntesis y degradación de glucoesfingolípidos más complejos (Figura 17.54). No obstante, en la disfunción genética de almacenamiento de lípidos denominada enfermedad de Gaucher se producen incrementos de hasta cien veces del contenido de glucocerebrósido en el

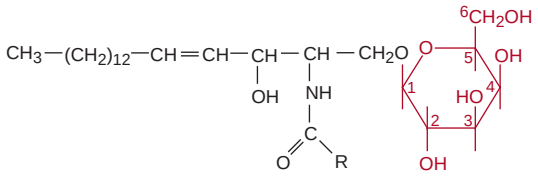


FIGURA 17.53
Estructura del galactocerebrósido (galactolípido).

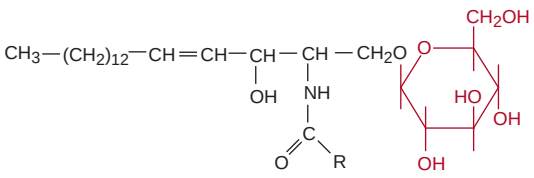


FIGURA 17.54
Estructura del glucocerebrósido.

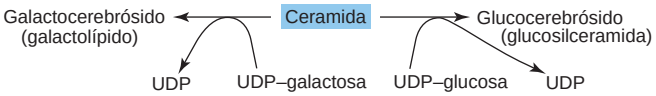


FIGURA 17.55
Síntesis de galacto- y glucocerebrósidos.

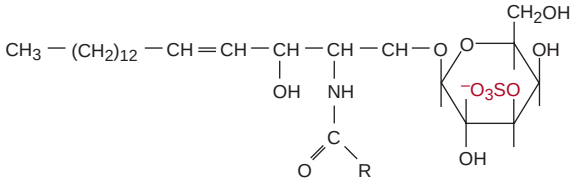


FIGURA 17.56
Estructura del galactocerebrósido sulfato (sulfolípido).

bazo y en el hígado, incremento que proviene de una deficiencia de la **glucocerebrosidasa** lisosómica.

El galactocerebrósido y el glucocerebrósido se sintetizan a partir de la ceramida y de los azúcares unidos a nucleótido activados UDP-galactosa y UDP-glucosa, respectivamente. Los enzimas que catalizan estas reacciones, **glucosil** y **galactosil transferasas**, están asociados al retículo endoplasmático (Figura 17.55). La síntesis de glucocerebrósido (glucosilceramida) tiene lugar en algunos tejidos mediante glucosilación de la esfingosina, en una reacción catalizada por la glucosiltransferasa:

$$\text{esfingosina} + \text{UDP-glucosa} \rightarrow \text{glucosilesfingosina} + \text{UDP}$$

seguido por acilación grasa:

$$\text{glucosilesfingosina} + \text{estearil CoA} \rightarrow \text{glucocerebrósido} + \text{CoASH}$$

Un sulfátido es un éster del ácido sulfúrico y galactocerebrósido

El **sulfátido**, o **sulfogalactocerebrósido**, es un éster de ácido sulfúrico del galactocerebrósido. El galactocerebrósido 3-sulfato es el principal sulfolípido en el cerebro y constituye aproximadamente el 15% de los lípidos de la sustancia blanca (Figura 17.56). El galactocerebrósido sulfato se sintetiza a partir del galactocerebrósido y 3′-fosfoadenosina 5′-fosfosulfato (PAPS), en una reacción catalizada por la sulfotransferasa:

$$\text{galactocerebrósido} + \text{PAPS} \rightarrow \text{PAP} + \text{galactocerebrósido 3-sulfato}$$

La estructura del PAPS, denominado a veces "sulfato activado" se indica en la Figura 17.57. En la leucodistrofia metacromática se acumulan grandes cantidades de sulfátido en el sistema nervioso central, lo cual es debido a la deficiencia de una sulfatasa lisosómica.

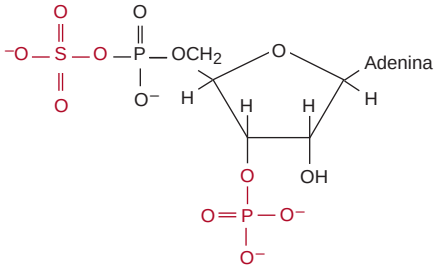


FIGURA 17.57
Estructura del PAPS (3′-fosfoadenosina-5′-fosfosulfato).

Los globósidos son oligosacáridos de ceramida

Los **globósidos** son cerebrósidos que contienen dos o más residuos de azúcar, normalmente galactosa, glucosa o *N*-acetilgalactosamina. Los oligosacáridos de ceramida son compuestos neutros y no contienen grupos amino libres. La lactosilceramida es un componente de la membrana eritrocitaria (Figura 17.58). Otro globósido importante es la **ceramida trihexósido** o ceramida galactosil-lactósido: ceramida-

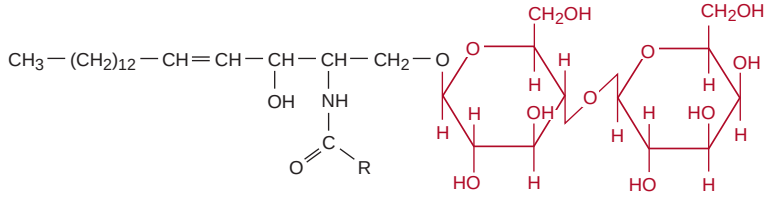


FIGURA 17.58
Estructura de la ceramida-β-glc-(4 → 1)-β-gal (lactosilceramida).

β-glc(4 → 1)-β-gal(4 → 1)-α-gal. Nótese que el residuo de galactosa terminal de este globósido tiene la configuración anomérica α. La ceramida trihexósido se acumula en los riñones de los pacientes que padecen la enfermedad de Fabry que carecen de la actividad α-galactosidasa A lisosómica.

Los gangliósidos contienen ácido siálico

Los gangliósidos son glucoesfingolípidos que contienen ácido siálido y que están concentrados en gran cantidad en las células ganglionares del sistema nervioso central, especialmente en las terminaciones nerviosas. El sistema nervioso central es diferente de los otros tejidos del hombre, ya que más de la mitad del ácido siálico que contiene está unido a lípidos de ceramida, mientras que el resto del ácido siálico se encuentra en los oligosacáridos de las glucoproteínas. En las membranas plasmáticas de las células de la mayor parte de los tejidos extraneurales se dan menores cantidades de glangliósidos no llegando al 10% del ácido siálico total.

El **ácido neuramínico** (abreviado Neu) está presente en los gangliósidos, glucoproteínas y mucinas. El grupo amino del ácido neuramínico se halla muy frecuentemente en forma de derivado *N*-acetilo, denominándose la estructura resultante **ácido *N*-acetilneuramínico** o **ácido siálico**, comúnmente abreviado **NANA** (Figura 17.59). El grupo hidroxilo en C-2 se presenta muy a menudo en la configuración anomérica α, y la unión entre el NANA y la ceramida oligosacárido implica siempre el grupo OH de la posición 2 del ácido *N*-acetilneuramínico. En la Tabla 17.3 se indican las estructuras de algunos de los gangliósidos más comunes. Los principales gangliósidos cerebrales son G_{M1}, G_{D1a}, G_{D1b} y G_{T1b}. Casi todos los gangliósidos del cuerpo provienen de la familia de compuestos que se originan con glucosilceramida. Respecto a la nomenclatura de los sialoglucoesfingolípidos, la letra G hace referencia al nombre ganglósido. Los subíndices M, D, T y Q indican mono-, di-, tri- y quatri (tetra)-ácidos siálicos contenidos en el ganglósido. Los subíndices numéricos 1, 2 y 3 designan la secuencia glucídica que está unida a la ceramida según la forma siguiente: 1, Gal-GalNAc-Gal- Glc-ceramida; 2, GalNAc-Gal-Glc-ceramida y 3, Gal-Glc-ceramida. Consideremos la nomenclatura del ganglósido de Tay–Sachs; la designación G_{M2} denota la estructura del ganglósido que se muestra en la Tabla 17.3.

Un ganglósido específico de las células de la mucosa intestinal fija la **toxina del cólera**, una proteína de M_r 84 000 secretada por el patógeno *Vibrio cholerae*. La toxina estimula la secreción de iones cloruro a la luz intestinal, lo que da lugar a una diarrea grave, característica del cólera. La toxina del cólera comprende dos clases de

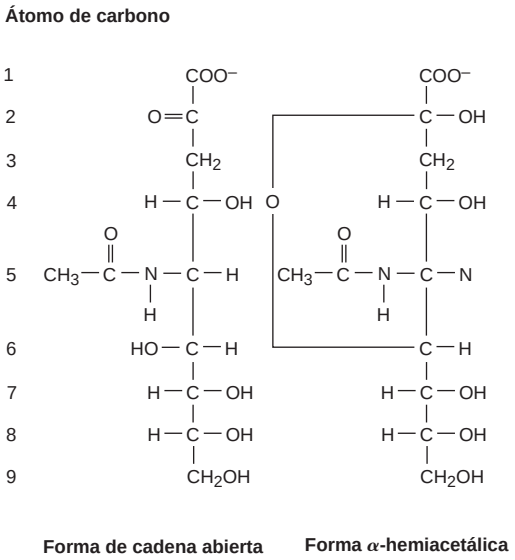


FIGURA 17.59
Estructura del ácido *N*-acetilneuramínico (NANA).

TABLA 17.3 Estructuras de algunos gangliósidos comunes

Nombre codificado	*Estructura química*
G_{M3}	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer} \\ \quad\quad 3 \\ \quad\quad \uparrow \\ \quad\quad \alpha\text{NANA} \end{array}$
G_{M2}	$\begin{array}{l} \text{GalNAc}\beta \rightarrow 4\text{Gal}\beta \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer} \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad 3 \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad \uparrow \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad \alpha\text{NANA} \end{array}$
G_{M1}	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta \rightarrow 4\text{Gal}\beta \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer} \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad 3 \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \uparrow \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \alpha\text{NANA} \end{array}$
G_{D1a}	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta \rightarrow 4\text{Gal}\beta \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer} \\ \quad 3 \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad 3 \\ \quad \uparrow \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \uparrow \\ \quad \alpha\text{NANA} \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \alpha\text{NANA} \end{array}$
G_{D1b}	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta \rightarrow 4\text{Gal}\beta \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer} \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad 3 \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \uparrow \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \alpha\text{NANA8} \leftarrow \alpha\text{NANA} \end{array}$
G_{T1a}	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta \rightarrow 4\text{Gal}\beta \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer} \\ \quad 3 \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad 3 \\ \quad \uparrow \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \uparrow \\ \quad \alpha\text{NANA8} \leftarrow \alpha\text{NANA} \quad\quad\quad \alpha\text{NANA} \end{array}$
G_{T1b}	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta \rightarrow 4\text{Gal}\beta \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer} \\ \quad 3 \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad 3 \\ \quad \uparrow \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \uparrow \\ \quad \alpha\text{NANA} \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \alpha\text{NANA8} \leftarrow \alpha\text{NANA} \end{array}$
G_{Q1b}	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta \rightarrow 4\text{Gal}\beta \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer} \\ \quad 3 \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad 3 \\ \quad \uparrow \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \uparrow \\ \quad \alpha\text{NANA8} \leftarrow \alpha\text{NANA} \quad\quad\quad \alpha\text{NANA8} \leftarrow \alpha\text{NANA} \end{array}$

subunidades, A y B; existe una subunidad A (28 000 Da) y cinco B (~ 11 000 Da cada una). Después de fijarse a la membrana de la superficie de la célula a través de un dominio de la subunidad B, la subunidad activa A pasa al interior de la célula. Una vez en ésta, actúa como una **ADP-ribosiltransferasa**, y transfiere ADP-ribosa del NAD^+ a la subunidad $G_{\alpha s}$ de una proteína G en la cara citoplasmática de la membrana celular (véase p. 1094). Esto conduce a la activación de la adenilato ciclasa y el cAMP así generado estimula entonces el transporte de ion cloruro y produce diarrea. El dominio coleragenoide, como se denomina a las subunidades B, se fija al ganglósido G_{M1}, que tiene la estructura que se muestra en la Tabla 17.3.

Los gangliósidos pueden ser también receptores de otros agentes tóxicos, tales como la **toxina tetánica** y ciertos virus, tales como los virus de la gripe. Existen también especulaciones acerca de que los gangliósidos podrían jugar un papel informador en las interacciones intercelulares, al proporcionar determinantes de reconocimiento específicos en la superficie de las células.

Varias enfermedades de almacenamiento de lípidos implican la acumulación de glucoesfingolípidos que contienen ácido siálico. Las dos **gangliosidosis** más comunes afectan al almacenamiento de los gangliósidos G_{M1} (gangliosidosis G_{M1}) y G_{M2} (enfermedad de Tay–Sachs). La gangliosidosis G_{M1} es una enfermedad metabólica autosómica recesiva, caracterizada por función psicomotora afectada, retraso mental, hepatoesplenomegalia y muerte en los primeros años de vida. La acumulación cerebral y visceral masiva del ganglósido G_{M1} se debe a una profunda deficiencia de β-galactosidasa.

Las esfingolipidosis son enfermedades de almacenamiento lisosómico con defectos en la ruta catabólica de los esfingolípidos

Los esfingolípidos se degradan normalmente dentro de los lisosomas de las células fagocitarias, especialmente los histiocitos o macrófagos del sistema retículo-endotelial, localizados principalmente en el hígado, bazo y médula ósea. La degradación de los esfingolípidos por los órganos viscerales empieza con la ingestión de las membranas de los leucocitos y eritrocitos, que son ricos en lactosilceramida (Cer-Glc-Gal) y hematósido (Cer-Glc-Gal-NANA). En el cerebro, la mayoría de los lípidos del tipo cerebrósido son gangliósidos. Especialmente durante el período neonatal, el recambio de los gangliósidos en el sistema nervioso central es muy extenso, por lo que los esfingolípidos son degradados y resintetizados rápidamente. En la Figura 17.60 se resume el catabolismo de los esfingolípidos. Obsérvese que entre los distintos esfingolípidos que constituyen esta ruta existe un éster sulfato (en el sulfolípido o sulfogalactolípido); grupos de ácidos *N*-acetilneuramínico (en los gangliósidos); un residuo de galactosa unido por enlace α (en la ceramida trihexósido); diversos β-galactósidos (en el galactocerebrósido y en G_{M1}); el ganglósido G_{M2}, que finaliza

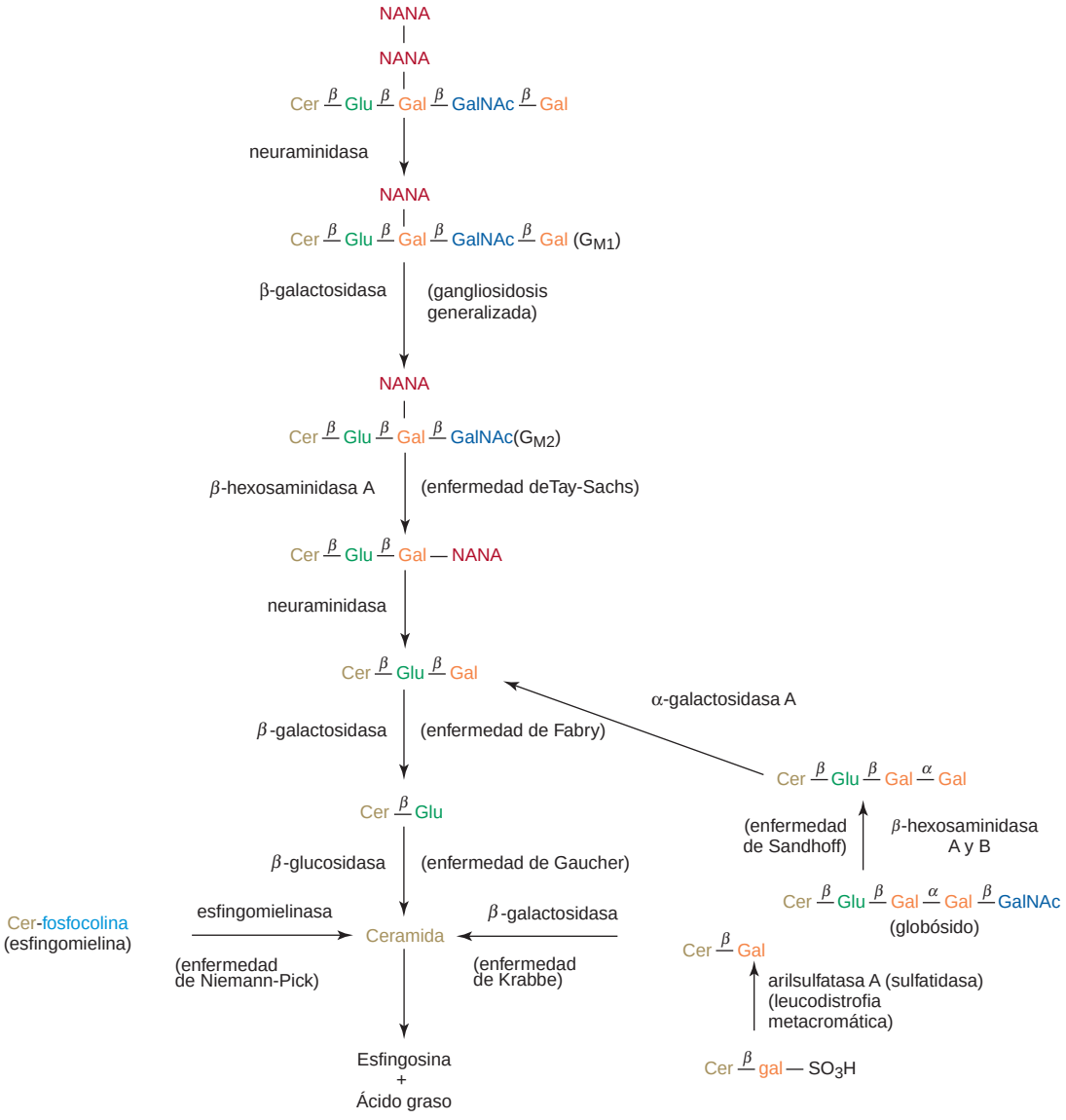


FIGURA 17.60
Resumen de las rutas del catabolismo de los esfingolípidos por los enzimas lisosómicos.
Las enfermedades genéticas de deficiencia enzimática se indican entre paréntesis.

con una unidad de *N*-acetilgalactosamina unida por enlace β; y el glucocerebrósido, que está compuesto por un solo residuo de glucosa unido a la ceramida mediante un enlace β. El enlace fosfodiéster de la esfingomielina se rompe produciendo ceramida, la cual, a su vez, se convierte en esfingosina por rotura de un enlace amida con un ácido graso de cadena larga. Esta ruta global requiere una serie de enzimas que rompen enlaces específicos en los compuestos que forman la ruta: entre estos enzimas se incluyen α- y β-galactosidasas, una β-glucosidasa, una neuraminidasa, hexosaminidasa, una fosfodiesterasa específica de la esfingomielina (esfingomielinasa), una sulfato esterasa (sulfatasa) y una amidasa específica para la ceramida (ceramidasa). Existen seis características importantes de la ruta catabólica de los esfingolípidos. (1) Todas las reacciones tienen lugar en el lisosoma, esto es, los enzimas de la vía están contenidos en los lisosomas. (2) Los enzimas son hidrolasas; por tanto, en cada una de las reacciones, uno de los sustratos es el agua. (3) El pH óptimo de cada una de las hidrolasas está en la zona ácida, pH 3,5–5,5. (4) La mayoría de los enzimas son relativamente estables y se presentan como isozimas. Por ejemplo, existen dos formas de hexosaminidasa: hexosaminidasa A (HexA) y hexosaminidasa B (HexB). (5) Las hidrolasas de la ruta de los esfingolípidos son glucoproteínas, y a menudo están firmemente unidas a la membrana lisosómica. (6) La ruta está formada por una serie de intermedios que solamente difieren en una molécula de azúcar, un grupo sulfato o un residuo de ácido graso. Los sustratos se convierten en productos mediante la separación secuencial y escalonada de constituyentes tales como azúcares y sulfato mediante reacciones hidrolíticas irreversibles.

En la mayoría de las ocasiones, el catabolismo de los esfingolípidos funciona perfectamente, y todos los glucoesfingolípidos complejos y la esfingomielina se degradan en sus constituyentes básicos, a saber, azúcares, sulfato, ácido graso, fosfocolina y esfingosina. Sin embargo, cuando la actividad de uno de los enzimas hidrolíticos de la ruta está marcadamente reducida debido a un error genético, el sustrato del enzima defectuoso o ausente se acumula y deposita dentro de los lisosomas del tejido responsable del catabolismo de ese esfingolípido. Para la mayor parte de las reacciones de la Figura 17.60, se han identificado pacientes que carecen del enzima que cataliza normalmente aquella reacción. Estas enfermedades, denominadas **esfingolipidosis**, se resumen en la Tabla 17.4.

TABLA 17.4 Enfermedades de almacenamiento de esfingolípidos en humanos

Enfermedad	*Principales signos y síntomas*	*Sustancia de almacenamiento principal*	*Deficiencia enzimática*
1. Enfermedad de Tay–Sachs	Retraso mental, ceguera, mancha rojo cereza sobre la mácula, muerte entre el segundo y tercer año	Ganglíosido G_{M2}	Hexosaminidasa A
2. Enfermedad de Gaucher	Aumento del hígado y del bazo, erosión de los huesos largos y de la pelvis, retraso mental sólo en la forma infantil	Glucocerebrósido	Glucocerebrosidasa
3. Enfermedad de Fabry	Erupción cutánea, insuficiencia renal, dolor en las extremidades inferiores	Ceramida trihexósido	α-Galactosidasa A
4. Enfermedad de Niemann–Pick	Aumento del hígado y del bazo, retraso mental	Esfingomielina	Esfingomielinasa
5. Leucodistrofia globoide (enfermedad de Krabbe)	Retraso mental, ausencia de mielina	Galactocerebrósido	Galactocerebrosidasa
6. Leucodistrofia metacromática	Retraso mental, los nervios se tiñen de marrón amarillento con el colorante violeta de cresilo (metacromasia)	Sulfátido	Arilsulfatasa A
7. Gangliosidosis generalizada	Retraso mental, aumento del hígado, esqueleto afectado	Ganglíosido G_{M1}	Ganglíosido G_{M1}: β-galactosidasa
8. Enfermedad de Sandhoff–Jatzkewitz	Lo mismo que 1; la enfermedad tiene un progreso mucho más rápido	Ganglíosido G_{M2}, globósido	Hexosaminidasa A y B
9. Fucosidosis	Degeneración cerebral, piel gruesa, parálisis muscular	Pentahexosilfucoglucolípido	α-L-Fucosidasa

Se puede generalizar sobre algunas de las características comunes de las **enfermedades de almacenamiento de los lípidos**: (1) normalmente sólo se acumula un único esfingolípido en los órganos afectados; (2) la porción ceramida está compartida por los diversos lípidos de almacenamiento; (3) la velocidad de biosíntesis del lípido que se acumula es normal; (4) en cada una de las enfermedades falta un enzima catabólico y (5) la deficiencia enzimática tiene lugar en todos los tejidos.

Ensayos enzimáticos para el diagnóstico de esfingolipidosis

Puede hacerse el diagnóstico de una esfingolipidosis determinada a partir de una biopsia del órgano afectado, normalmente la médula ósea, hígado o cerebro, sobre bases morfológicas, en función del aspecto altamente característico del lípido almacenado en el interior de los lisosomas. Los ensayos enzimáticos se utilizan para confirmar el diagnóstico de una enfermedad de almacenamiento de lípido determinada. En la mayoría de las enfermedades, los leucocitos periféricos, los fibroblastos cutáneos cultivados y el vello coriónico muestran la deficiencia enzimática involucrada, pudiendo así ser utilizados como fuente de enzima con fines diagnósticos. En algunos casos (p. ej., enfermedad de Tay–Sachs), se han utilizado el suero e incluso las lágrimas como fuente de enzima para el diagnóstico de una enfermedad de almacenamiento de lípido. En su mayor parte, las esfingolipidosis son autosómicas recesivas, dándose la enfermedad solamente en los homocigóticos con un defecto en ambos alelos. Los ensayos enzimáticos se pueden también utilizar para identificar portadores o heterocigotos.

En la **enfermedad de Niemann–Pick**, el enzima deficiente es la **esfingomielinasa**, la cual cataliza normalmente la reacción mostrada en la Figura 17.61. La esfingomielina, marcada radiactivamente en los grupos metilo de la colina con carbono-14, constituye un sustrato útil para determinar la actividad esfingomielinasa. Los extractos de leucocitos de controles sanos hidrolizan el sustrato marcado y producen el compuesto hidrosoluble fosfocolina. La extracción del medio de incubación final con un disolvente orgánico tal como el cloroformo tiene como resultado la presencia de radiactividad en la fase acuosa superior; en la fase clorofórmica se encontrará el sustrato lipídico esfingomielina no utilizado. Por otro lado, si los leucocitos provienen de un paciente con la enfermedad de Niemann–Pick, después de la incubación con el sustrato radiactivo y la posterior extracción con cloroformo, no se encontrará apenas radiactividad (es decir fosfocolina) en la fase acuosa, con lo que quedará confirmado el diagnóstico.

Otra enfermedad que se puede diagnosticar con un sustrato artificial es la **enfermedad de Tay–Sachs**, la forma más frecuente de **gangliosidosis G_{M2}**. En esta enfermedad mortal, las células ganglionares del córtex cerebral se hinchan y los lisosomas son engullidos con el lípido ácido, gangliósido G_{M2}. Esto lleva a una desaparición de las células ganglionares, a la proliferación de las células gliales, y a la desmielinización de los nervios periféricos. El hallazgo patognómico es una mancha rojo cereza en la mácula causada por el hinchamiento y la necrosis de las células ganglionares del ojo. En la enfermedad de Tay–Sachs, el sustrato artificial 4-metilumbeliferil-β-*N*-acetilglucosamina, se utiliza para confirmar el diagnóstico. El compuesto

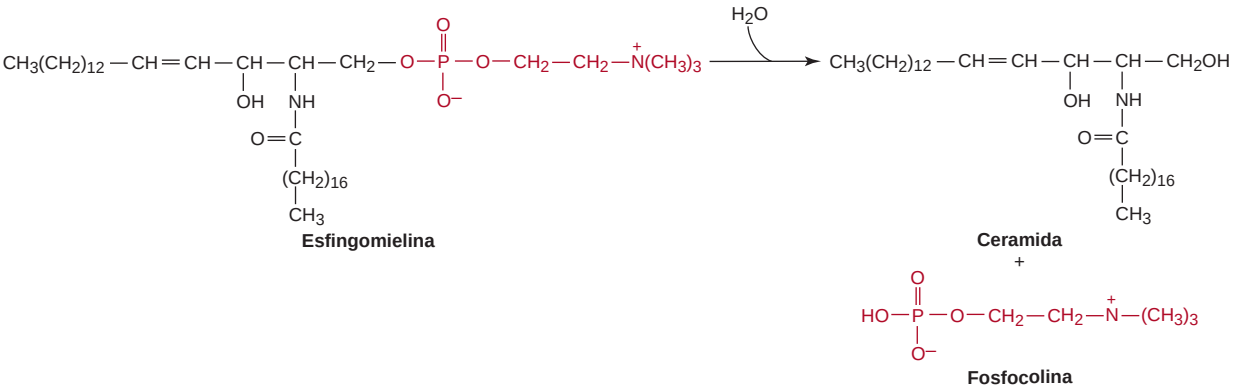
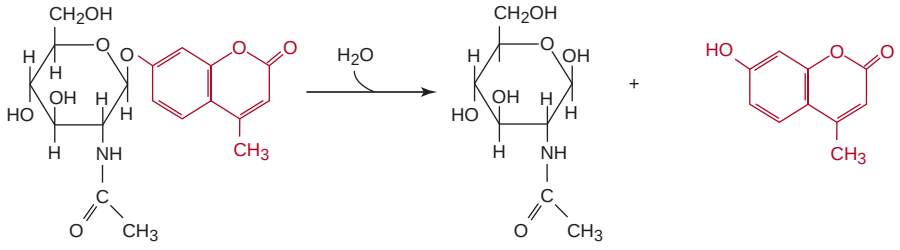


FIGURA 17.61
Reacción de la esfingomielinasa.



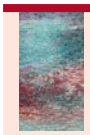
4-Metilumbeliferil-β-D-*N*-acetilglucosamina **_N_-Acetilglucosamina** **4-Metilumbeliferona (fluorescente en medio alcalino)**

FIGURA 17.62
Reacción de la β-hexosaminidasa.

es hidrolizado por la hexosaminidasa A, la hidrolasa lisosómica deficitaria, dando un producto intensamente fluorescente, la 4-metilumbeliferona (Figura 17.62). Desgraciadamente, el diagnóstico puede ser desvirtuado por la presencia de hexosaminidasa B, existente en extractos de tejidos y fluidos corporales. La hexosaminidasa B no está ausente en el paciente de Tay–Sachs e hidroliza el sustrato de prueba. El problema se resuelve generalmente aprovechando la relativa labilidad térmica de la hexosaminidasa A y la termoestabilidad de la hexosaminidasa B. La muestra de extracto tisular o de suero que se ha de ensayar se calienta en primer lugar a 55 °C durante 1 h, y a continuación se determina la actividad hexosaminidasa. La cantidad de actividad termolábil es, así, una medida de la hexosaminidasa A, valor que es utilizado para el diagnóstico.

Los ensayos enzimáticos de suero o extractos de tejidos, leucocitos periféricos y fibroblastos son útiles en la detección de heterocigosis. Una vez identificados los portadores de una enfermedad de almacenamiento de lípidos, o bien si previamente ya ha habido un niño afectado en la familia, pueden controlarse los embarazos con riesgo de estas enfermedades. Las nueve enfermedades de almacenamiento de lípidos se transmiten en forma de anormalidades genéticas recesivas. Excepto en una de estas enfermedades, en todas las demás la anormalidad se encuentra en un cromosoma autosómico. La excepción es la **enfermedad de Fabry** que está ligada al cromosoma X. En todas estas enfermedades, y según cálculo estadístico, uno de cada cuatro fetos será homocigoto (o hemicigoto en la enfermedad de Fabry), dos fetos serán portadores y uno será completamente normal. Los procedimientos de ensayo enzimáticos se han utilizado para detectar fetos afectados y portadores *in utero*, utilizando fibroblastos cultivados, obtenidos por amniocentesis como fuente de enzima.

Con excepción de la **enfermedad de Gaucher**, no existe terapia para las esfingolipidosis; en el momento actual, el papel de la medicina es la prevención mediante consejo genético, en base a ensayos enzimológicos del tipo antes tratado. En la Apli. Clín. 17.4 se hace una exposición del diagnóstico y la terapia de la enfermedad de Gaucher.



APLICACIÓN CLÍNICA 17.4
Diagnóstico de la enfermedad de Gaucher en un adulto

La enfermedad de Gaucher es una enfermedad hereditaria del catabolismo de lípidos que da lugar a depósitos de glucocerebrósidos en los macrófagos del sistema retículo endotelial. Debido al elevado número de macrófagos en el bazo, médula ósea e hígado, el signo más común de esta enfermedad es la hepatomegalia, la esplenomegalia y sus secuelas (trombocitopenia o anemia) y osteítis.

La enfermedad de Gaucher es el resultado de una deficiencia de glucocerebrosidasa. Aunque dicha deficiencia enzimática es hereditaria, se observan diversos patrones clínicos. Algunos enfermos sufren graves carencias neurológicas desde la infancia, mientras que otros no experimentan ningún síntoma hasta llegar a la edad adulta. El diagnóstico puede realizarse mediante la comprobación de la capacidad de los leucocitos o los fibroblastos para hidrolizar el enlace β-glucosídico de sustratos artificiales (actividad β-glucosidasa) o de glucocerebrósidos (actividad glucocerebrosidasa). La enfermedad de Gaucher ha sido tratada con infusiones regulares de glucocerebrosidasa purificada.

Friedman, B. A., Vaddi, K., Preston, E. M., Cataldo, J. R. y McPherson, J. M. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived β-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood* 93:2807, 1999.

17.5 | PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS

Las prostaglandinas y los tromboxanos son derivados de ácidos monocarboxílicos de veinte carbonos

En las células de mamíferos existen dos rutas principales para el metabolismo del ácido araquidónico que producen importantes intermediarios de funciones celulares y corporales: se trata de las **rutas de la ciclooxigenasa** y de la **lipoxigenasa**. El sustrato en ambos casos es el ácido araquidónico no esterificado. La ruta de la ciclooxigenasa conduce a una serie de compuestos, entre los que se hallan las prostaglandinas y los tromboxanos. Las prostaglandinas se descubrieron gracias a sus efectos sobre el músculo liso, ya que favorecen la contracción de los músculos intestinal y uterino, a la vez que reducen la presión sanguínea. A pesar de que la complejidad de sus estructuras y la variedad de sus a veces contradictorias funciones crean a menudo un sentimiento de frustración, los potentes efectos farmacológicos de las prostaglandinas les han otorgado un lugar de excepción en la biología y la medicina humanas. Con excepción de los hematíes, las prostaglandinas se sintetizan y se liberan en casi todas las células y los tejidos de los mamíferos. A diferencia de la mayoría de las hormonas, las prostaglandinas no se almacenan en las células, sino que se sintetizan y se liberan sin dilación.

Las tres clases principales de **prostaglandinas** son las series **A**, **E** y **F**. En la Figura 17.63 se muestran las prostaglandinas A, E y F más comunes. Todas ellas están relacionadas con el ácido prostanoico (Figura 17.64). Obsérvese que las prostaglandinas contienen diversos grupos funcionales; por ejemplo, la PGE_2 contiene un grupo carboxilo, una β-hidroxicetona, un alcohol alquílico secundario y dos dobles enlaces carbono–carbono. Las tres clases se distinguen en base a los grupos funcionales presentes en el anillo de ciclopentano: la serie E contiene una β-hidroxicetona, la serie F son 1,3-dioles, y las de la serie A son cetonas α,β-insaturadas. Los subíndices 1, 2 y 3 se refieren al número de dobles enlaces presentes en las cadenas laterales. El subíndice α se refiere a la configuración del grupo OH en C-9: un grupo α-hidroxilo se proyecta por "debajo" del plano del anillo.

El precursor más importante de las prostaglandinas ingerido en la dieta es el ácido linoleico (18:2), que es un ácido graso esencial. En los adultos, el ácido li-

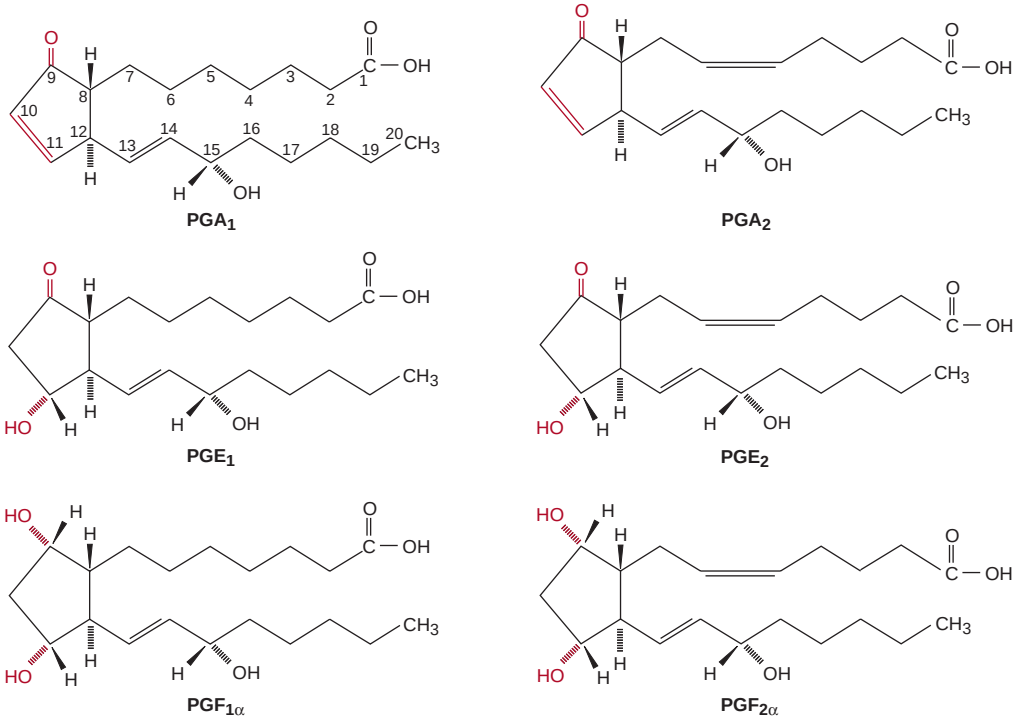


FIGURA 17.63
Estructuras de las principales prostaglandinas.

noleico se ingiere diariamente en cantidades de unos 10 g. Sólo una parte mínima de esta ingesta total se convierte, por alargamiento y desaturación, en ácido araquidónico (ácido icosatetraenoico) en el hígado, y en cierta medida también en ácido dihomo-γ-linoleico. Dado que la excreción diaria total de prostaglandinas y de sus metabolitos es de sólo alrededor de 1 mg, queda claro que la formación de prostaglandinas es una ruta cuantitativamente poco importante en el metabolismo global de los ácidos grasos. No obstante, el metabolismo de las prostaglandinas depende completamente de un suministro constante y regular de ácido linoleico.

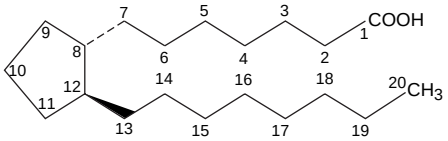


FIGURA 17.64
Estructura del ácido prostanoico.

En la síntesis de las prostaglandinas interviene una ciclooxigenasa

Los precursores inmediatos de las prostaglandinas son ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, que contienen 3, 4 y 5 dobles enlaces carbono–carbono. Debido a que el **ácido araquidónico** y la mayoría de sus metabolitos contienen 20 átomos de

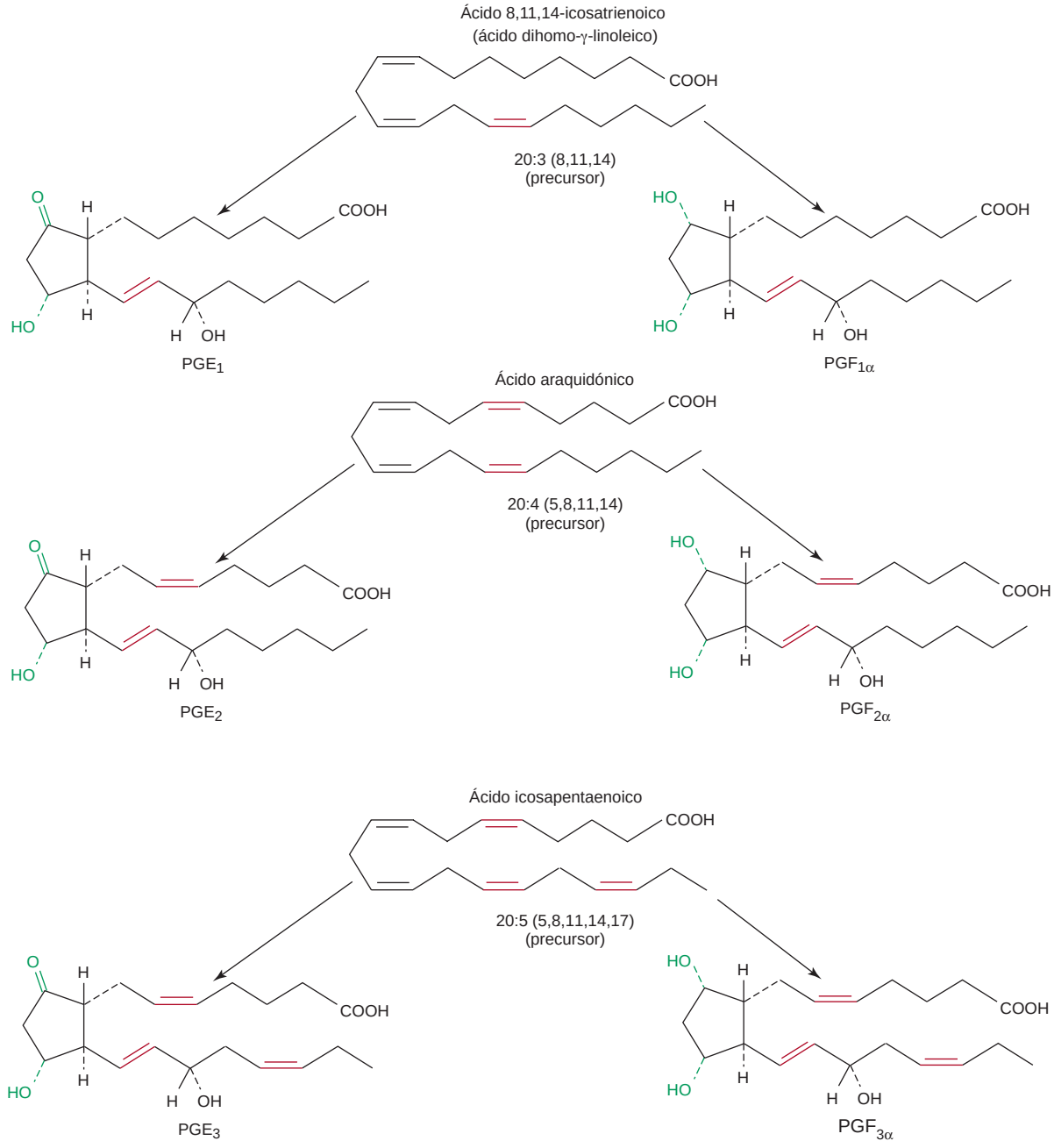


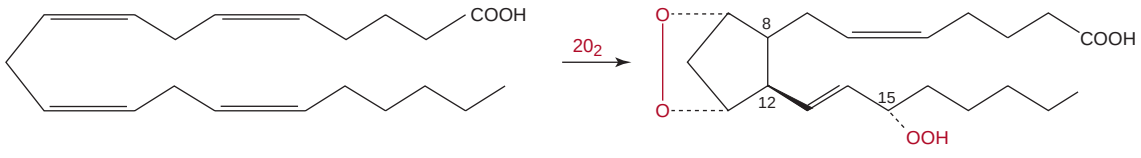
FIGURA 17.65
Síntesis de las prostaglandinas E y F a partir de los ácidos grasos precursores.

carbono, se les denomina **icosanoides**. Durante su transformación en las diversas prostaglandinas estos ácidos grasos se ciclan y captan oxígeno. El ácido dihomo-γ-linoleico (20:3(8,11,14)) es el precursor de la PGE_1 y de la $PGF_{1\alpha}$; el ácido araquidónico (20:4(5,8,11,14)) es el precursor de la PGE_2 y de la $PGF_{2\alpha}$, y el ácido icosapentaenoico (20:5(5,8,11,14,17)) es el precursor de la PGE_3 y de la $PGF_{3\alpha}$ (Figura 17.65).

Los compuestos de la serie 2 derivados del ácido araquidónico son las prostaglandinas principales en el hombre, y son también los de mayor significado biológico. El sistema enzimático central de la biosíntesis de prostaglandinas es la **prostaglandina G/H sintasa (PGS)**, bifuncional que cataliza la ciclación oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados. El ácido araquidónico proviene de fosfolípidos de membrana por acción de la hidrolasa **fosfolipasa A_2**. Este paso de rotura es el paso limitante de velocidad en la síntesis de prostaglandinas, y ciertos agentes que estimulan la producción de prostaglandinas lo hacen estimulando la actividad de la fosfolipasa A_2. Los ésteres del colesterol que contienen ácido araquidónico también sirven como fuente de ácido araquidónico.

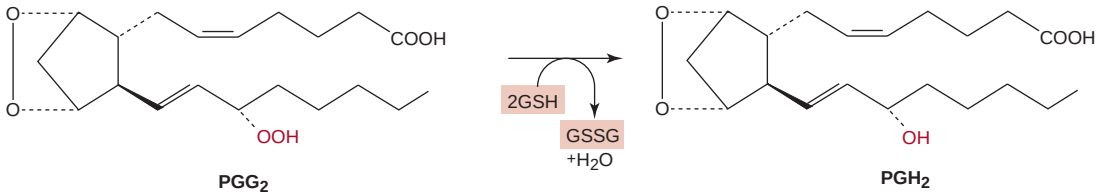
El componente **ciclooxigenasa (COX)** del complejo de la prostaglandina sintasa cataliza la ciclación de los átomos de carbono C-8 a C-12 del ácido araquidónico para formar el 9,11-endoperóxido cíclico 15-hidroperóxido PGG_2. Esta reacción requiere dos moléculas de oxígeno (Figura 17.66). El mecanismo implica eliminación específica del hidrógeno 13-pro-*S* del ácido araquidónico. El PGG_2 se convierte seguidamente en prostaglandina H_2 (PGH_2) por una **peroxidasa dependiente de glutatión (PG hidroperoxidasa)** reducida (Figura 17.67). Quedan por elucidar los detalles de los pasos adicionales que conducen a las diferentes prostaglandinas. Las reacciones que ciclan los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en las membranas del retículo endoplasmático. En la Figura 17.68 se resumen las rutas principales de biosíntesis de prostaglandinas. La formación de las prostaglandinas primarias de las series D, E y F y de los tromboxanos o la prostaciclina (PGI_2) se lleva a cabo por diferentes enzimas específicos, cuya presencia varía en función del tipo de célula y de tejido. Esto produce cierto grado de especificidad de tejido en cuanto al tipo y cantidad de prostaglandina producida. En el riñón y en el bazo, las principales prostaglandinas producidas son la PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$. Por el contrario, en los vasos sanguíneos, se producen mayoritariamente PGI_2 y $PGF_{2\alpha}$. En el corazón, la PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ y la PGI_2 se producen en cantidades similares. El tromboxano A_2 (TXA_2) es el principal endoperóxido de prostaglandina formado en las plaquetas.

Existen dos formas de ciclooxigenasa (COX) o prostaglandina G/H sintasa (PGS). La **COX-1**, o **PGS-1**, es un enzima constitutivo que se encuentra en la mucosa gástrica, las plaquetas, el endotelio vascular y el riñón. La **COX-2**, o **PGS-2**, es inducible, y se genera en respuesta a la inflamación. La COX-2 se expresa principalmente en macrófagos activados y en monocitos cuando son estimulados por el **factor activador plaquetario** (PAF), la **interleuquina-1**, o el lipopolisacárido bacteriano (LPS), y en las células del músculo liso, células epiteliales y endoteliales y neuronas. La inducción de la PGS-2 es inhibida por los glucocorticoides. Las dos



Ácido araquidónico — PGG_2

FIGURA 17.66
Reacción de la ciclooxigenasa.



PGG_2 — PGH_2

FIGURA 17.67
Conversión de la PGG_2 en PGH_2; reacción de la PG hidroperoxidasa (PGH sintasa).

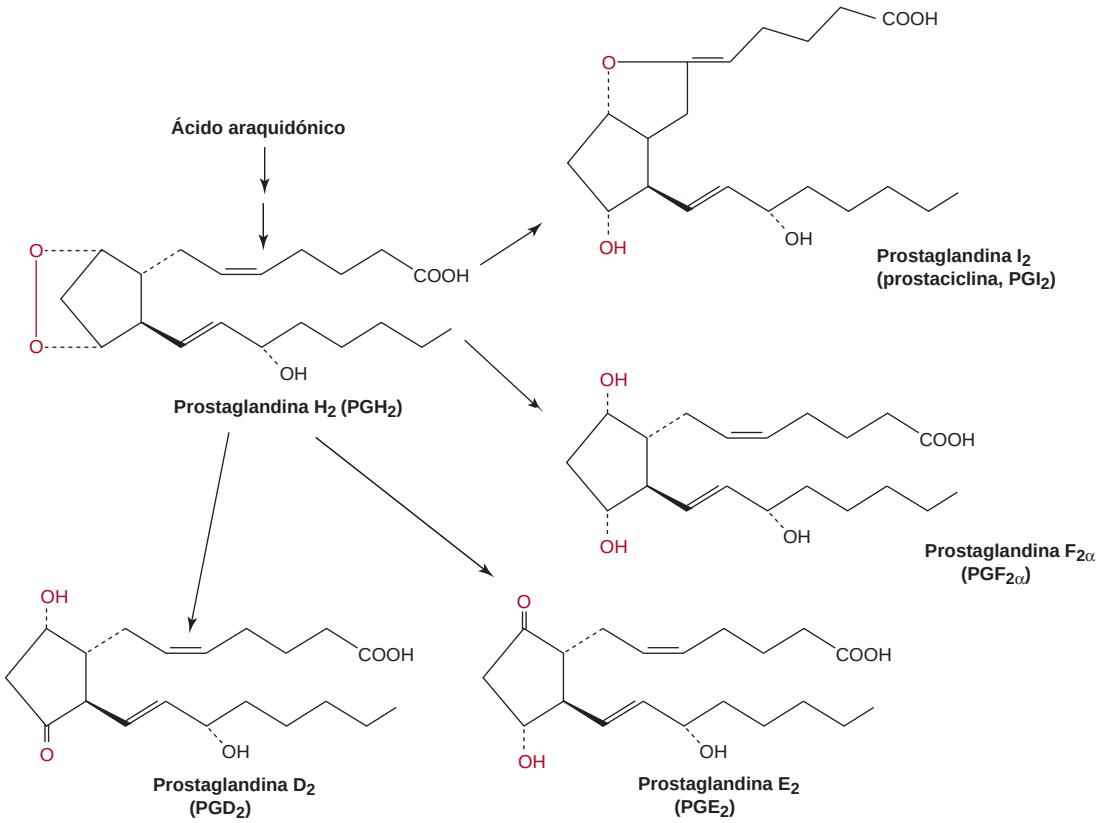


FIGURA 17.68
Rutas principales de biosíntesis de prostaglandinas.

formas de PGS catalizan tanto la oxigenación del ácido araquidónico a PGG_2 como la reducción de la PGG_2 a PGH_2.

Las prostaglandinas tienen una vida media muy corta. Poco después de su liberación, son captadas rápidamente por las células en donde son inactivadas, bien por oxidación del grupo hidroxilo en C-15 bien por β-oxidación a partir del extremo carboxilo de la cadena. Los pulmones juegan un papel importante en la inactivación de las prostaglandinas.Los tromboxanos, son metabolitos muy activos de los endoperóxidos de las prostaglandinas tipo PGG_2 y PGH_2, que tienen en lugar del anillo ciclopentano otro anillo de seis átomos que contiene oxígeno (oxano). El término tromboxano proviene del hecho de que estos compuestos poseen un potencial de formación de trombos. La **tromboxano A_2 sintasa**, presente en el retículo endoplasmático, es abundante en el pulmón y en las plaquetas, y cataliza la conversión del endoperóxido PGH_2 en TXA_2. La vida media del TXA_2 en el agua es muy corta ($t_{1/2} \approx 1$ min), y se transforma rápidamente en tromboxano B_2 (TXB_2) inactivo por la reacción que se muestra en la Figura 17.69.

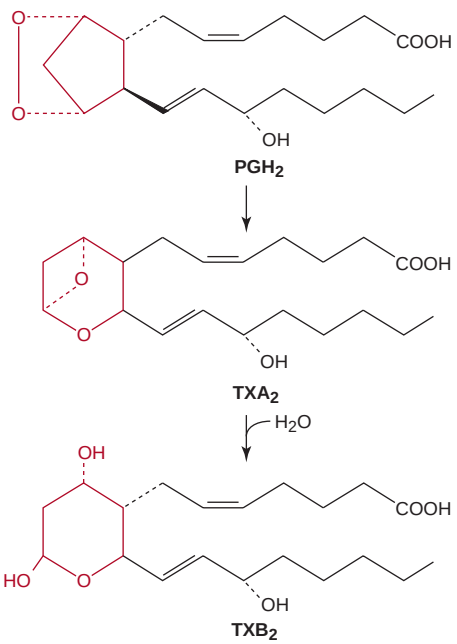


FIGURA 17.69
Síntesis del TXB_2 a partir de PGH_2.

La producción de prostaglandinas es inhibida por agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides

Los **agentes antiinflamatorios no esteroides** (**"nonsteroidal anti-inflammatory drugs", NSAID**), tales como la aspirina (ácido acetilsalicílico), indometacina y fenilbutazona, bloquean la producción de prostaglandinas al inhibir irreversiblemente el enzima ciclooxigenasa. En el caso de la aspirina, la inhibición tiene lugar por acetilación del enzima. Otros NSAIDs inhiben la ciclooxigenasa pero lo hacen uniéndose de forma no covalente al enzima en lugar de acetilarlo; se denominan "NSAID diferentes de la aspirina". La aspirina es el único inhibidor de la COX que modifica el enzima de manera covalente siendo más potente contra la COX-1 que contral la COX-2. La mayoría de NSAID inhiben la COX-1 más que la COX-2. La COX es una diana importante de agentes farmacológicos. Estos fármacos tienen efectos secundarios indeseables: puede producirse anemia aplástica como resultado de la terapia con fenilbutazona. Los **fármacos antiinflamatorios esteroides**, tales como la hidrocortisona, prednisona y betametasona, bloquean la liberación de prostaglandinas al inhibir la actividad fosfolipasa A_2, con lo cual interfieren en la movilización

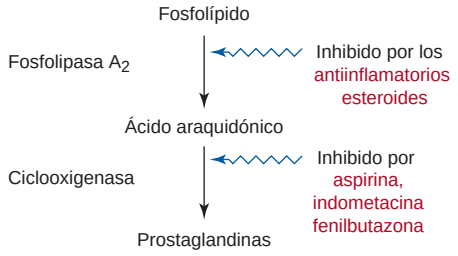


FIGURA 17.70
Sitios de acción de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas.

del ácido araquidónico (Figura 17.70). El paso limitante de velocidad de la síntesis de prostaglandinas es la liberación del ácido araquidónico de los depósitos de los fosfolípidos de membrana en respuesta a la activación de la fosfolipasa A_2.

Se sabe poco acerca de los factores que controlan la biosíntesis de prostaglandinas; en general, parece que la liberación de prostaglandinas se desencadena después de excitación hormonal o neural o después de actividad muscular. Por ejemplo, la histamina incrementa la concentración de prostaglandina en los perfundidos gástricos. También se liberan prostaglandinas durante el parto y después de lesión celular (p. ej., plaquetas expuestas a la trombina, pulmones irritados por el polvo).

Las prostaglandinas producen numerosos efectos fisiológicos

Las prostaglandinas son unos agentes productores naturales de la **inflamación**. Las reacciones inflamatorias afectan muy a menudo a las articulaciones (p. ej., artritis reumatoide), piel (p. ej., psoriasis) y ojos, siendo frecuentemente estas inflamaciones tratadas con corticosteroides, que inhiben la síntesis de prostaglandinas. La administración de PGE_2 y PGE_1 induce los signos de la inflamación, entre los que se cuentan rojez y calor (debido a la vasodilatación arteriolar), e hinchazón y edema, como resultado del incremento de la permeabilidad capilar. La PGE_2 generada en los tejidos inmunes (como por ejemplo macrófagos, mastocitos, células B) ocasiona la quimiocinesis de las células T. La PGE_2 en cantidades que por sí solas no causan **dolor**, antes de la administración de los autocoides histamina y bradiquinina, aumenta tanto la intensidad como la duración del dolor causado por estos dos agentes. Se cree que los pirógenos (agentes que inducen la **fiebre**) activan la ruta biosintética de las prostaglandinas, dando así lugar a la liberación de PGE_2 en la región del hipotálamo, en la que se regula la temperatura corporal. La aspirina, que es un fármaco antipirético, actúa inhibiendo la ciclooxigenasa. Las prostaglandinas se han utilizado ampliamente como fármacos en el área de la **reproducción**. La PGE_2 y la PGF_2 se han utilizado para inducir el parto y para la finalización de un embarazo indeseado, específicamente en el segundo trimestre. Existen pruebas de que las prostaglandinas de la serie PGE pueden jugar también algún papel en la infertilidad de los machos.

Se ha demostrado que las prostaglandinas sintéticas son muy efectivas para la inhibición de la **secreción gástrica ácida** en pacientes con **úlceras pépticas**. El efecto inhibidor de los compuestos PGE se debe, al parecer, a la inhibición de la formación de cAMP en las células de la mucosa gástrica. Las prostaglandinas también aceleran la curación de las úlceras gástricas. Las prostaglandinas juegan un papel importante en el control del tono de los vasos sanguíneos y de la **presión sanguínea arterial**. Las prostaglandinas vasodilatadoras PGE, PGA y PGI_2, disminuyen la presión arterial sistémica, incrementando así el flujo local de sangre y disminuyendo a la vez la resistencia periférica. El TXA_2 provoca la contracción del músculo liso vascular y del mesangio glomerular. Existen esperanzas de que las prostaglandinas puedan resultar útiles en el tratamiento de la hipertensión. La PGE_2 funciona en el feto para mantener abierto el **conducto arterioso** antes del nacimiento. Cuando el conducto arterioso permanece abierto después del nacimiento, se puede acelerar el cierre mediante administración del inhibidor de la ciclooxigenasa indometacina. En otras situaciones, puede ser deseable mantener el conducto abierto. Por ejemplo, en el caso de los niños nacidos con anormalidades congénitas y en los que el defecto se puede corregir quirúrgicamente, la infusión de prostaglandinas mantiene el flujo sanguíneo a través del conducto en este período interino.

Ciertas prostaglandinas, especialmente PGI_2, inhiben la **agregación plaquetaria**, mientras que la PGE_2 y TXA_2 promueven este proceso de coagulación. El TXA_2 es producido por las plaquetas, y es la causa de la agregación espontánea que tiene lugar cuando las plaquetas entran en contacto con alguna superficie extraña, colágeno o trombina. Las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos liberan PGI_2, lo que puede explicar la falta de adherencia de las plaquetas a la pared de los vasos sanguíneos sanos. La PGE_2 y la PGD_2 dilatan los vasos sanguíneos renales y aumentan el flujo sanguíneo a través del riñón. También regulan la secreción de sodio y la velocidad de filtración glomerular.

17.6 | LIPOXIGENASA Y ÁCIDOS OXI-ICOSATETRAENOICOS

La ciclooxigenasa dirige los ácidos grasos poliinsaturados a la ruta de las prostaglandinas. Otro enzima oxigenante del ácido araquidónico igualmente importante,

llamado **lipoxigenasa**, es una dioxigenasa. Existe una familia de lipoxigenasas que se diferencian por la posición del doble enlace de la molécula del ácido araquidónico en la que se produce el primer ataque del oxígeno (por ejemplo, las posiciones 5, 12 ó 15). Los leucotrienos más importantes en humanos son los productos de la 5-lipoxigenasa, que están implicados en los trastornos inflamatorios. Las lipoxigenasas se encuentran en una gran variedad de plantas y hongos, así como en animales, pero están ausentes en las levaduras y en la mayoría de procariotas. Las lipoxigenasas contienen un único átomo de hierro no-hemo siendo activas cuando el hierro se encuentra en el estado férrico.

Los ácidos monohidroperoxi-icosatetraenoicos son productos de la acción de la lipoxigenasa

La lipoxigenasa adiciona grupos hidroperóxido al ácido araquidónico produciendo **ácidos monohidroperoxi-icosatetraenoicos (HPETE).** La Figura 17.71 muestra la conversión del ácido araquidónico en los tres HPETE principales. De esta forma, contrariamente al componente ciclooxigenasa de la prostaglandina endoperóxido sintasa, que cataliza la bis-dioxigenación de ácidos grasos insaturados a endoperóxidos, las lipoxigenasas catalizan la monodioxigenación de ácidos grasos insaturados a hidroperóxidos alílicos. La sustitución por hidroperóxidos del ácido araquidónico por las lipoxigenasas puede tener lugar en las posiciones 5, 12 ó 15. En los basófilos, leucocitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos, mastocitos y cualquier órgano que desarrolle una respuesta inflamatoria, el principal producto de la lipoxigenasa es el 5-HPETE; en las plaquetas, células de los islotes pancreáticos, músculo liso vascular y células glomerulares, predomina el 12-HPETE; el 15-HPETE es el principal producto de la lipoxigenasa en los reticulocitos, eosinófilos, linfocitos T y células epiteliales de la tráquea. Las 5-, 12- y 15-lipoxigenasas se encuentran fundamentalmente en el citosol. Estímulos o señales específicos determinan cuál es el tipo de producto de la lipoxigenasa fabricado en una célula dada. El átomo de car-

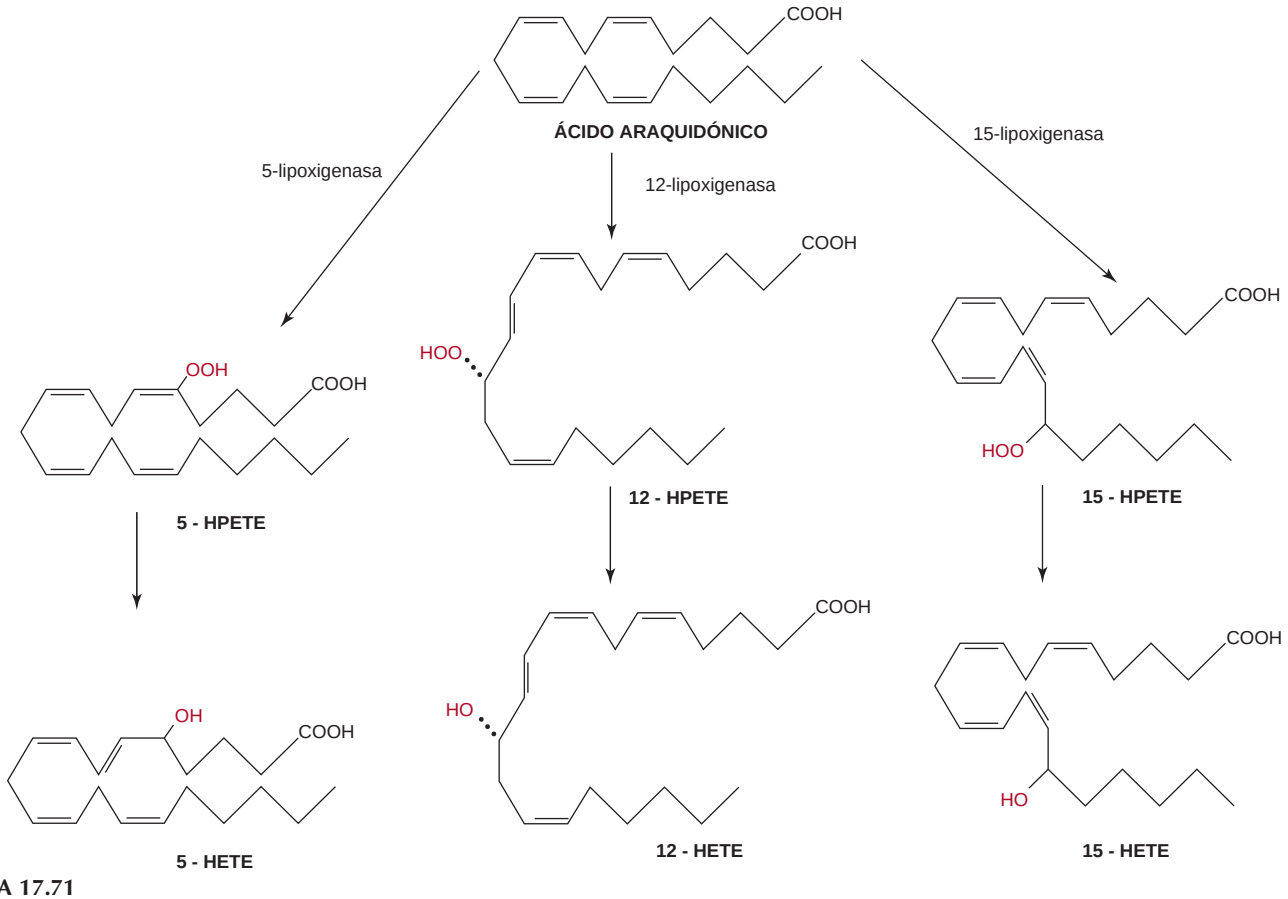


FIGURA 17.71
Reacción de la lipoxigenasa y papel de los ácidos 5-hidroperoxi-icosatetraenoicos (HPETE) como precursores de los ácidos hidroxi-icosatetraenoicos (HETE).

bono oxigenado de los HPETE es asimétrico, por lo que existen dos posibles estereoisómeros del ácido hidroperóxido, (*R*) o (*S*). Por ejemplo, se especifica la estereoconfiguración en 12*R*-LOX o 12*S*-LOX. Los tres HPETE principales poseen la configuración (*S*). La 5-lipoxigenasa (5-LOX) posee tanto actividad dioxigenasa, que convierte el ácido araquidónico en 5-HPETE, como actividad deshidratasa, que transforma el 5-HPETE en LTA_4. La actividad 5-LOX está restringida a unos pocos tipos de células, incluidos los linfocitos B, pero no los T. Se activa mediante una proteína accesoria llamada proteína activadora de la 5-lipoxigenasa (FLAP). En los leucocitos humanos la FLAP actúa como proteína transferidora de ácido araquidónico que presenta el ácido graso sustrato a la 5-LOX localizada en la membrana nuclear.

Los leucotrienos y los ácidos hidroxi-icosatetraenoicos son hormonas derivadas de los HPETE

Los **hidroperóxidos HPETE** no son hormonas, sino intermediarios altamente reactivos e inestables que se convierten por reducción de sus grupos peróxido en sus alcoholes análogos (hidroxiácidos grasos) o en leucotrienos. Los **leucotrienos** son productos de la lipoxigenasa que contienen al menos tres dobles enlaces conjugados. En la Figura 17.72 se muestra cómo el 5-HPETE se reordena dando el epóxido leucotrieno A_4 (LTA_4), que se convierte en LTB_4 o LTC_4. Este hecho pone de relieve que el 5-HPETE se encuentra en un punto de bifurcación estratégico en la ruta de la lipoxigenasa.

En la Figura 17.71 se ilustra la reducción peroxidativa del 5-HPETE al compuesto estable **ácido 5-hidroxi-icosatetraenoico (5-HETE)**. Los dobles enlaces en el 5-HETE se encuentran en las posiciones 6, 8, 11 y 14, no están conjugados y su geometría es, respectivamente, trans, cis, cis, cis. Otras dos formas habituales de HETE son 12- y 15-HETE. Los HPETE se reducen a los HETE correspondientes, sea de forma espontánea, sea por la acción de las peroxidasas.

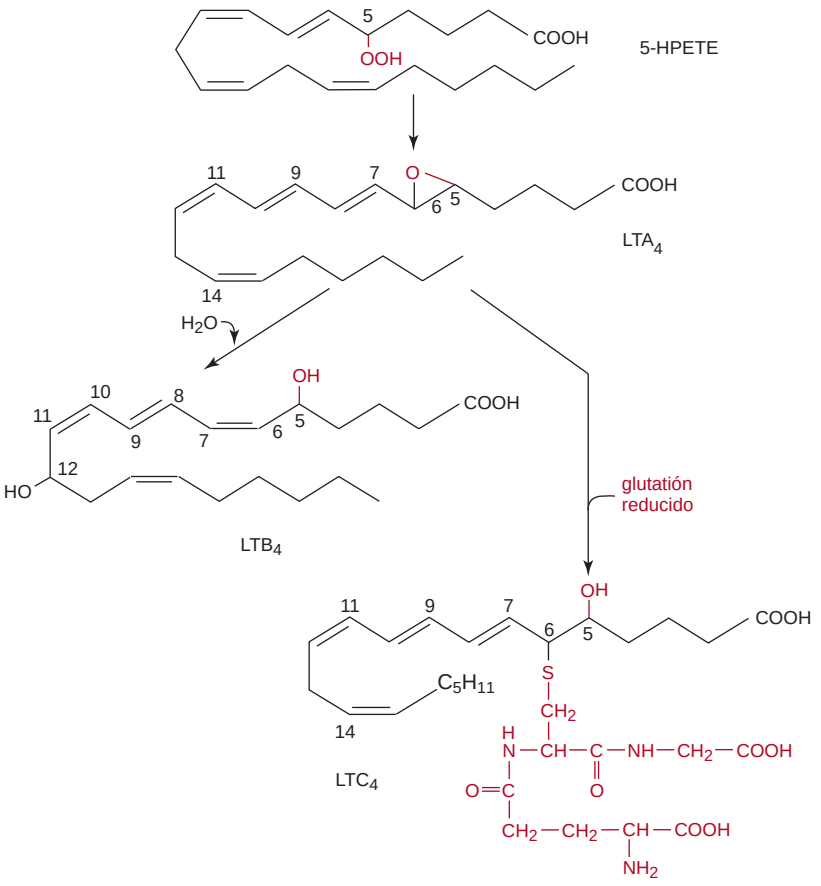


FIGURA 17.72
Conversión del 5-HPETE en LTB_4 y LTC_4 a través del intermediario LTA_4.

Los leucotrienos provienen del precursor inestable 5-HPETE mediante una reacción en la que se genera el epóxido denominado LTA_4, reacción catalizada por la **LTA_4 sintasa**. En las series de leucotrienos, el subíndice indica el número de dobles enlaces. Así, aunque es posible la redistribución de los dobles enlaces, el número de éstos en el producto leucotriénico será el mismo que en el ácido araquidónico original. El LTA_4 se encuentra en una bifurcación (Figura 17.72), y puede convertirse, bien en el ácido 5,12-dihidroxi-icosatetraenoico (denominado leucotrieno B_4 o LTB_4), bien en los leucotrienos LTC_4 y LTD_4.

La conversión de 5-HPETE en el diol LTB_4 (Figura 17.72) es catalizada por un enzima citosólico, la **LTB_4 sintasa** (LTA_4 hidratasa), que adiciona agua al doble enlace situado entre los carbonos 11 y 12. La conversión del LTA_4 en los leucotrienos LTC_4, LTD_4 y LTE_4 necesita de la participación de glutatión reducido, el cual abre el anillo de epóxido del LTA_4 para producir LTC_4 (Figura 17.72). Dipeptidasas específicas eliminan secuencialmente los residuos de ácido glutámico y de glicina, dando lugar así a los leucotrienos LTD_4 y LTE_4 (Figura 17.73). El subíndice 4 indica el número total de dobles enlaces.

Los leucotrienos y los HETE afectan a varios procesos fisiológicos

El tiempo de permanencia de los leucotrienos en el cuerpo es de unas cuatro horas. La ω-oxidación secuencial del extremo metilo y la β-oxidación de la cadena de ácido graso terminada en COOH resultante son responsables de la inactivación y degradación del LTB_4 y LTE_4. Estas reacciones tienen lugar en las mitocondrias y

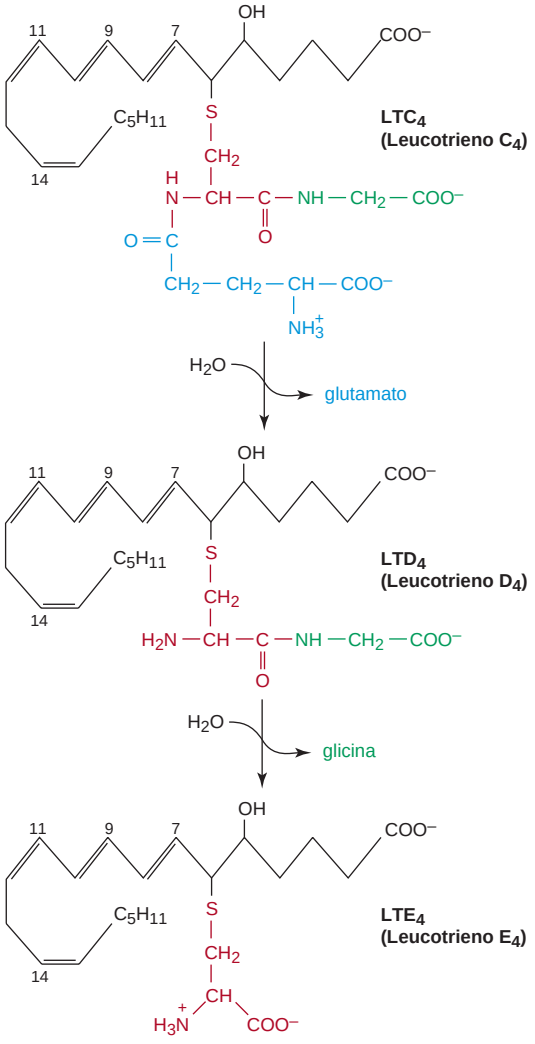


FIGURA 17.73
Conversión del LTC_4 en LTD_4 y LTE_4.

en los peroxisomas. Las acciones biológicas de los tionilpéptidos LTC_4, LTD_4 y LTE_4 incluyen la **sustancia de reacción lenta de la anafilaxis** (SRS-A). Estas acciones provocan una contracción lenta pero prolongada de los músculos lisos en las vías respiratorias y en el tracto gastrointestinal. El LTC_4 se convierte rápidamente en LTD_4, que a su vez se convierte lentamente en LTE_4. Estas conversiones están catalizadas por enzimas plasmáticos. El LTB_4 y los sulfopéptidos LTC_4, LTD_4 y LTE_4 ejercen su acción biológica a través de interacciones ligando–receptor específicas. En el hombre la activación de la 5-LOX de los leucocitos produce leucotrienos y dihidroxi-icosanoides (p. ej., LTB_4) que dan lugar a broncoconstricción e inflamación. Entre los fármacos corrientes para el asma se cuentan los inhibidores de la 5-LOX y antagonistas del receptor de leucotrienos.

En general, los HETE (especialmente el 5-HETE) y el LTB_4 están fundamentalmente implicados en la regulación de la función de neutrófilos y eosinófilos: actúan como mediadores de la quimiotaxis, estimulan la adenilato ciclasa, e inducen en los leucocitos PMN la desgranulación y la liberación de los enzimas hidrolíticos lisosómicos. En cambio, LTC_4 y LTD_4 son agentes humorales que promueven la contracción del músculo liso, la constricción de los conductos pulmonares, de la tráquea y del intestino, y que elevan la permeabilidad de los capilares (edema). Parece ser que los HETE ejercen sus efectos al ser incorporados en los fosfolípidos de las células diana. La presencia de cadenas acilo graso que contienen un grupo OH polar pueden perturbar el empaquetamiento de lípidos, y con ello la estructura y la función de la membrana. El LTB_4 tiene una actividad inmunosupresora, ejercida a través de la inhibición de las células $CD4^+$ y la proliferación de las células supresoras $CD8^+$. El LTB_4 también promueve la adhesión entre los neutrófilos y las células endoteliales.

Los ácidos monohidroxi-icosatetraenoicos que componen la ruta de la lipoxigenasa son potentes mediadores de los procesos implicados en la alergia (hipersensibilidad) e inflamación, en las secreciones (por ejemplo, la insulina), en los movimientos y el crecimiento celulares, y en los flujos de calcio. El acontecimiento inicial en la reacción alérgica, es decir, la unión de un anticuerpo IgE a los receptores de la superficie de los mastocitos, provoca la liberación de una serie de sustancias, entre las que se encuentran los leucotrienos, denominadas mediadores de la hipersensibilidad inmediata. Los productos de la lipoxigenasa aparecen normalmente pocos minutos después del estímulo. Los leucotrienos LTC_4, LTD_4 y LTE_4 son mucho más potentes que la histamina para provocar la contracción de los músculos lisos no vasculares de los bronquios e intestino. El LTD_4 incrementa la permeabilidad microvascular. El LTB_4 y los mono-HETE estimulan la migración (quimiotaxis) de eosinófilos y neutrófilos, y esto los convierte en los principales mediadores de la infiltración de los leucocitos PMN en las reacciones inflamatorias.

Los **ácidos icosatrienoicos** (por ejemplo, el ácido dihomo-γ-linoleico) y el **ácido icosapentaenoico** (Figura 17.65) también sirven como sustratos de la lipoxigenasa. En los tejidos, la cantidad de estos ácidos grasos C20 poliinsaturados con tres y cinco doble enlaces es menor que la del ácido araquidónico, pero una dieta especial puede aumentar su nivel. Por lo general, los productos de la lipoxigenasa de esos tri y pentaicosanoides son menos activos que LTA_4 o LTB_4. Aún queda por establecer si dietas de aceite de pescado ricas en ácido icosapentaenoico son útiles en el tratamiento de enfermedades alérgicas y autoinmunes.

Es muy activa la investigación farmacéutica sobre los usos terapéuticos de inhibidores de lipoxigenasas y ciclooxigenasas y de inhibidores y agonistas de los leucotrienos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como el asma, la psoriasis, la artritis reumatoide y la colitis ulcerosa.

BIBLIOGRAFÍA

Metabolismo de fosfolípidos

Johnson, D. R., Bhatnager, R. S., Knoll, L. J. y Gordon, J. I. Genetic and biochemical studies of protein *N*-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* 63:869, 1994.

Kazzi, S.N., Schurch, S., McLaughlin, K.L., Romero, R. y Janisse, J. Surfactant phospholipids and surface activity among preterm infants with respiratory distress syndrome who develop bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr.* 89:1218, 2000.

Kent, C., Carman, G. M., Spence, W. y Dowhan, W. Regulation of eukaryotic phospholipid metabolism. *FASEB J.* 5:2258, 1991.

McConville, M. J. y Ferguson, M. A. J. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294:305, 1993.

Nishizuka, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellulalr responses. *FASEB J.* 9:484, 1995.

Rameh, L.E. y Cantley, L.C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.*274:8347, 1999

Snyder, F. Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochem. Biophys. Acta* 1254:231, 1995.

Stevens, V. L. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem. J.* 310:361, 1995.

Tjoelker, L.W. y Stafforini, D.M. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochem. Biophys. Acta* 1488:102, 2000.

Topham, M.K. y Prescott, S.M. Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J. Biol. Chem.* 274:11447, 1999.

Zwaal, R.F.A., Comfurius, P. y Bever, E.M. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochem. Biophys. Acta*1376:433, 1998

Síntesis del colesterol

Goldstein, J. L. y Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425, 1990.

Gordon, D. J. y Rifkind, B. M. High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N. Engl. J. Med*. 321:1311, 1989.

Ness, G.N. y Chambers, C.M. Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the concept of cholesterol buffering capacity. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*164:8, 1999.

Sviridov, D. Intracellular cholesterol trafficking. *Histol. Histopathol.* 14:305, 1999.

Lipoproteínas

McNamara, D.J. Dietary fatty acids, lipoproteins and cardiovascular disease. *Adv. Food. Nutr. Res.* 36:253, 1999.

White, D.A., Bennett, A.J., Billett, M.A. y Salter, A.M. The assembly of triacylglycerol-rich lipoproteins: an essential role for the microsomal triacylglycerol transfer protein *Br. J. Nutr.* 80:219, 1998.

Esfingolípidos y esfingolipidosis

Grabowski, G. A., Gatt, S. y Horowitze. M. Acid β-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25:385, 1990.

Friedman, B.A., Vaddi, K., Preston, E.M., Cataldo, J.R. y McPherson, J.M. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived β-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy un treatment of Gaucher disease. *Blood* 93:2807, 1999.

Linke, T., Wilkening, G., Sadeghlar, F., Moczall, H., Bernardo, K., Schuchman, E. y Sandhoff, K. Interfacial regulation of acid ceramidase activity: stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *J. Biol. Chem.*276:5760, 2001.

Tensioactivo pulmonar

Ainsworth, S.B., Beresford, M.W., Milligan, D.W.A., Shaw, N.J., Matthews, J.N.S., Fenton, A.C. y Ward-Platt, M.P. Pumactan and poractant alfa for treatment of respiratory distress syndrome in neonates born 25-29 weeks' gestation: a randomized trial. *Lancet* 355:1387, 2000.

Caminici, S. P. y Young, S. The pulmonary surfactant system. *Hosp. Pract.* 26:87, 1991.

Pryhuber, G.S. Regulation of pulmonary surfactant protein B. *Mol. Gen. Metab.* 64:217, 1998.

Prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos

Brash, A.R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274:23679, 1999.

Breyer, M.D. y Breyer, R.M. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279:F12, 2000.

Goetzl, E. J., An, S. y Smith, W. L. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J.* 9:1051, 1995.

Gravito, R.M. y DeWitt, D.L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochem. Biophys. Acta* 1441:278, 1999.

Henderson, W. R. Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Intern. Med.* 121:684, 1994.

Herschman, H.R. Function and regulation of prostaglandin synthase 2. *Adv. Exp. Med. Biol.* 469:3, 1999.

Kam, P.C. y See, A.U. Cyclooxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 55:442, 2000.

Marnett, L.J., Rowlinson, S.W., Goodwin, D.C., Kalgutkar, A.S. y Lanzo, S.A. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *J. Biol. Chem.* 274:22903, 1999.

Mayatapek, E. y Hoffmann, G. Leukotrienes: biosynthesis, metabolism and pathophysiologic significance. *Pediatr. Res.* 37:1, 1995.

Sardesai, V. M. Biochemical and nutritional aspects of eicosanoids. *J. Nutr. Biochem.* 3:562, 1992.

Whittle, B.J.R. COX-1 and COX-2 products in the gut: therapeutic impact of COX-2 inhibitors. *Gut* 47:320, 2000.

Ácidos biliares

Agellon, L.B. y Torchia, E.C. Intracellular transport of bile acids. *Biochem. Biophys. Acta* 1486:198, 2000.

Gilat, T., Somjen, G.L., Mazur, Y., Leikin-Frenkel, A., Rosenberg, R., Halpern, Z. y Konikoff, F. Fatty acid bile acid conjugates (FABACs) –new molecules for the prevention of cholesterol crystallisation in bile. *Gut* 48:75, 2001.

Leonard, M.R., Bogle, M.A., Carey, M.C. y Donovan, J.M. Spread monomolecular films of monohydroxy bile acids and their salts: influence of hydroxyl position, bulk pH, and association with phosphatidylcholine. *Biochemistry* 39:16064, 2000.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Entre las funciones de los diferentes fosfolípidos se encuentran todas las siguientes, EXCEPTO:
   A. reconocimiento intercelular.
   B. actuar de tensioactivo en los pulmones.
   C. la activación de determinados enzimas de membrana.
   D. transducción de señal.
   E. mediador de la hipersensibilidad y la respuesta inflamatoria aguda.

2. ¿Cuál de los siguientes es el grupo correcto de enzimas implicado en la síntesis de fosfatidilcolina en el tejido adiposo?
   A. colina fosfotransferasa, glicerol quinasa, ácido fosfatídico fosfatasa.
   B. colina fosfotransferasa, glicerol fosfato:acil transferasa, fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferasa.
   C. glicerol fosfato:acil transferasa, α-glicerolfosfato deshidrogenasa, ácido fosfatídico fosfatasa.
   D. glicerol fosfato:acil transferasa, α-glicerolfosfato deshidrogenasa, glicerol quinasa.
   E. α-glicerolfosfato deshidrogenasa, glicerol quinasa, ácido fosfatídico fosfatasa.

3. CDP-X (donde X es el alcohol apropiado) reacciona con el 1,2-diacilglicerol en la ruta de síntesis primaria de:
   A. fosfatidilcolina.
   B. fosfatidilinositol.
   C. fosfatidilserina.

D. todas las anteriores.
E. ninguna de las anteriores.

4. Las fosfolipasas A_1 y A_2:
   A. no desempeñan ningún papel en la síntesis de los fosfolípidos.
   B. son las responsables de la inserción inicial de los ácidos grasos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 durante la síntesis.
   C. son las responsables del cambio de base en la interconversión entre fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.
   D. hidrolizan los ácidos fosfatídicos para dar diglicéridos.
   E. eliminan un ácido graso de la posición *sn*-1 o *sn*-2, de forma que pueda ser reemplazado por otro en la síntesis de fosfolípidos.

5. Los ácidos biliares primarios:
   A. son cualquier ácido biliar presente en el tracto intestinal.
   B. son cualquier ácido biliar reabsorbido por el tracto intestinal.
   C. son sintetizados por bacterias presentes en el tracto intestinal.
   D. son sintetizados por los hepatocitos directamente a partir del colesterol.
   E. se convierten en ácidos biliares secundarios por conjugación con glicina o taurina.

6. Un gangliósido puede contener todo lo siguiente, EXCEPTO:
   A. una estructura de ceramida.
   B. glucosa o galactosa.
   C. fosfato.
   D. uno o más ácidos siálicos.
   E. esfingosina.

7. Entre las características estructurales comunes a todas las prostaglandinas, se cuentan:
   A. 20 átomos de carbono.
   B. un anillo interno heterocíclico que contiene oxígeno.
   C. un grupo peróxido en el carbono 15.
   D. dos dobles enlaces.
   E. un grupo cetona.

8. El complejo de la prostaglandina sintasa:
   A. cataliza el paso limitante de velocidad de la síntesis de prostaglandinas.
   B. es inhibido por esteroides antiinflamatorios.
   C. contiene tanto un componente de ciclooxigenasa como de peroxidasa.
   D. produce PGG_2 como producto final.
   E. utiliza como sustrato el ácido araquidónico libre de la célula.

9. El tromboxano A_2:
   A. es una prostaglandina de larga vida.
   B. es un metabolito inactivo de la PGE_2.
   C. es la principal prostaglandina producida por todas las células.
   D. no tiene un anillo en su estructura.
   E. se sintetiza a partir del intermediario PGH_2.

10. Los ácidos hidroxiperoxi-icosatetraenoicos (HPETE):
    A. provienen del ácido araquidónico por la reacción de la peroxidasa.
    B. son agentes que intervienen en las reacciones de hipersensibilidad.
    C. son intermediarios de la formación de los leucotrienos.
    D. son compuestos relativamente estables (se mantienen hasta 4 h.).
    E. son las formas inactivadas de los leucotrienos.

Preguntas 11 y 12: La hipercolesterolemia es uno de los factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular. El colesterol total en sangre no es tan importante al considerar el riesgo como la distribución del colesterol entre las partículas de LDL ("malo") y HDL ("bueno"). Los esfuerzos para reducir el colesterol sérico son de dos tipos: dietético y farmacológico si al reducir el colesterol y las grasas saturadas de la dieta no es suficiente. Los medicamentos de elección son las estatinas inhibidoras del enzima limitante de velocidad de la biosíntesis del colesterol. En caso necesario pueden añadirse resinas fijadoras de ácidos biliares.

11. En la biosíntesis del colesterol:
    A. la HMG-CoA sintasa mitocondrial sintetiza el 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA (HMG CoA).
    B. la HMG-CoA reductasa cataliza el paso limitante de la velocidad.
    C. la conversión de ácido mevalónico en farnesil pirofosfato transcurre por condensación de tres moléculas de ácido mevalónico.
    D. la condensación de dos farnesil pirofosfatos para formar escualeno es una reacción reversible.
    E. la conversión de escualeno en lanosterol se inicia mediante la formación del sistema anular fusionado, seguida por adición de oxígeno.

12. El colesterol que se encuentra en las LDL (lipoproteínas de baja densidad):
    A. se une a un receptor celular y difunde a través de la membrana celular.
    B. cuando se introduce en la célula, suprime la actividad de la ACAT (acil CoA:colesterol aciltransferasa).
    C. una vez en la célula se convierte en ésteres de colesterol por acción de la LCAT (lecitina:colesterol acil transferasa).
    D. cuando se ha acumulado en la célula, inhibe la reposición de los receptores de LDL.
    E. representa principalmente colesterol que está siendo eliminado de células periféricas.

Preguntas 13 y 14: Las esfingolipidosis (enfermedades del almacenamiento de lípidos) son un grupo de enfermedades caracterizadas por defectos en enzimas lisosómicos. La velocidad de síntesis de los esfingolípidos es normal pero se acumula material no degradado en los lisosomas. La gravedad de una enfermedad concreta depende, en parte, de qué tejidos están más afectados. Las que afectan principalmente al cerebro y al tejido nervioso, tales como la enfermedad de Tay-Sachs, son letales a los pocos años del nacimiento. Dado que la extensión de la deficiencia enzimática es la misma en todas las células, tejidos fácilmente asequibles tales como los fibroblastos de la piel pueden ser utilizados para el ensayo de la deficiencia enzimática. Para la mayoría de las enfermedades no existe tratamiento por lo que el consejo genético parece ser la única alternativa válida. No obstante, en el caso de la enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa) es efectiva la terapia de reemplazamiento.

13. Todo lo siguiente es cierto sobre la degradación de los esfingolípidos, EXCEPTO:
    A. la realizan los enzimas hidrolíticos contenidos en los lisosomas.
    B. finaliza a nivel de las ceramidas.
    C. es una eliminación secuencial de constituyentes.
    D. puede estar implicada una sulfatasa o una neuraminidasa.
    E. la catalizan enzimas que son específicos para un tipo de enlace, en vez de para un compuesto en particular

14. En la enfermedad de Niemann-Pick, el enzima deficitario es la esfingomielinasa. Las esfingomielinas se diferencian del resto de los esfingolípidos en que:
    A. no se basan en una estructura central de ceramida.
    B. son ácidas y no neutras a pH fisiológico.
    C. son las únicas que contienen ácido *N*-acetilneuramínico.
    D. son las únicas que son fosfolípidos.
    E. no son anfipáticas.

Problemas

15. Las células de un paciente con hipercolesterolemia familiar (FH) y las células de un individuo sin la enfermedad se incubaron con

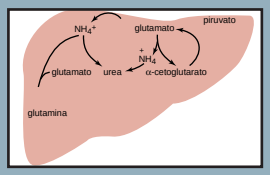
partículas de LDL que contenían colesterol marcado radiactivamente. Después de la incubación se eliminó el medio de incubación y se midió la radiactividad de las células. Las células se trataron para eliminar cualquier material unido, se lisaron, y se midió el contenido de colesterol interno. Los resultados se dan abajo. ¿Qué mutación del gen de la proteína del receptor de LDL podría explicar los resultados?

Tipo celular	*Radiactividad de la célula*	*Contenido en colesterol*
Normal	3000 cpm/mg de células	Bajo
FH	3000 cpm/mg de células	Alto

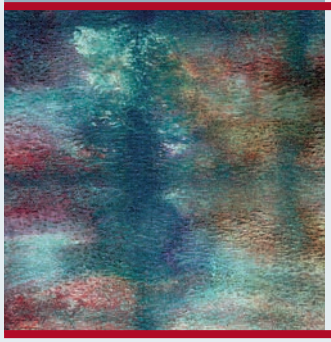
16. La combinación de resinas fijadoras de sales biliares y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa es muy efectiva en la reducción del colesterol sérico en la mayoría de pacientes con alto colesterol. ¿Por qué este tratamiento es mucho menos efectivo en los pacientes con hipercolesterolemia familiar?

RESPUESTAS

1. **A** Esta función parece estar asociada a los glucoesfingolípidos complejos B: Especialmente la dipalmitil lecitina. C: Por ejemplo la β-hidroxibutirato deshidrogenasa. D: Especialmente los fosfatidilinositoles. E: El factor de activación plaquetaria (PAF) realiza esta función.
2. **C** A, D y E: La glicerol quinasa no se encuentra en el tejido adiposo, que tiene que confiar en la α-glicerolfosfato deshidrogenasa. B: Éste es un proceso únicamente hepático.
3. **A** Esta es la ruta principal para la colina. B: El fosfatidilinositol se forma a partir de CDP-diglicérido que reacciona con mioinositol. C: Esta se forma mediante "intercambio de bases".
4. **E** Las fosfolipasas A_1 y A_2, como su nombre indica, hidrolizan un ácido graso a partir de un fosfolípido, y en consecuencia forman parte de la degradación de los fosfolípidos. También intervienen en la síntesis, sin embargo, al asegurar la distribución asimétrica de ácidos grasos que se da en los fosfolípidos.
5. **D** Son el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico. A, B: El tracto intestinal contiene una mezcla de ácidos biliares primarios y secundarios, todos los cuales son reabsorbidos. C: Los ácidos biliares secundarios se forman en el intestino por la acción de bacterias que realizan reacciones químicas tales como la eliminación del grupo 7-hidroxilo. E: El ácido cólico conjugado es aún un ácido biliar primario.
6. **C** Los glucoesfingolípidos no contienen fosfato. A y E: La ceramida, que se forma a partir de esfingosina, es la estructura básica a partir de la cual se forman los glucoesfingolípidos. B: Normalmente la glucosa es el primer azúcar que se une a una ceramida. D: Por definición, los gangliósidos deben contener ácido siálico.
7. **A** Las prostaglandinas son icosanoides. B: Esto es cierto para los tromboxanos, pero el anillo de las prostaglandinas contiene únicamente átomos de carbono. C: es cierto sólo para el intermediario de síntesis, la PGG_2. D: El número de dobles enlaces es variable. E: Cierto para las series A y E, pero no para la serie F.
8. **C** La ciclooxigenasa oxida el ácido araquidónico y la peroxidasa transforma la PGG_2 en PGH_2. A y B: El paso limitante de velocidad es la liberación del ácido graso precursor por la fosfolipasa A_2. Este es el paso inhibido por los esteroides antiinflamatorios. D: El componente peroxidasa convierte la PGG_2 en PGH_2. E: El ácido araquidónico no está libre en la célula, sino que forma parte de los fosfolípidos de membrana o, a veces de un éster del colesterol.
9. **E** La PGH_2 es el punto de ramificación en la síntesis de las prostaglandinas y tromboxanos. A-D: El TXA_2 es muy activo, tiene una vida media muy corta (del orden de segundos), contiene un anillo de seis átomos, y es la prostaglandina principal de las plaquetas pero no de todos los tejidos.
10. **C** Estos se forman por adición de oxígeno al ácido araquidónico. A: El enzima es una lipoxigenasa. B–E: Los HPETE, por sí mismos, no son hormonas, sino intermediarios altamente inestables que se convierten en HETE (mediadores de la hipersensibilidad) o en leucotrienos.
11. **B** Este enzima es inhibido por el colesterol. A: Recuérdese que la biosíntesis del colesterol tiene lugar en el citosol; la biosíntesis mitocondrial de HMG CoA conduce a la producción de cuerpos cetónicos. C: entre otras cosas el ácido mevalónico es descarboxilado para producir los isoprenil pirofosfatos, que son las unidades que se condensan. D: El pirofosfato es hidrolizado, lo que impide la reacción inversa. E: El proceso se inicia con la formación de epóxido.
12. **D** Esta es una de las formas de evitar la acumulación en la célula. A: Las LDL se unen a receptores celulares y experimentan endocitosis, para ser degradadas a continuación en los lisosomas y liberar el colesterol. B: La ACAT se activa para facilitar el almacenamiento. C: La LCAT es un enzima plasmático. E: El principal papel de las LDL es suministrar colesterol a los tejidos periféricos; la HDL elimina colesterol de los tejidos periféricos.
13. **B** Las ceramidas se hidrolizan a esfingosina y el ácido graso. C: El sulfogalactocerebrósido contiene sulfato y los gangliósidos contienen uno o más ácidos *N*-acetilneuramínicos. E: Muchos esfingolípidos comparten los mismos tipos de enlace (por ejemplo β-galactosídico), y un único enzima (por ejemplo la β-galactosidasa) lo hidroliza en donde esté presente.
14. **D** Las enfigomielinas no son glucoesfingolípidos sino fosfoesfingolípidos. A, B, E: Se forman a partir de las ceramidas y son anfipáticas y neutras. C es la definición de los gangliósidos.
15. Las células de FH tienen receptores LDL con propiedades de fijación normales tal como indica la radiactividad fijada que es la misma que la de las células normales. Son incapaces de internalizar el complejo receptor-LDL por lo que no es inhibida la síntesis de colesterol tal como sucede en las células normales. La mutación tiene lugar probablemente en el extremo carboxilo de la proteína ya que éste está implicado en la internalización. Asegúrese que entiende por qué una mutación en otras regiones no llevaría a los resultados observados.
16. Al fijar las sales biliares, lo que fuerza un aumento en la excreción, el hígado ha de convertir más colesterol en sales biliares. Si se inhibe la síntesis hepática de colesterol, el hígado sintetiza más receptores de LDL, lo que elimina más partículas LDL (y por tanto colesterol) de la sangre. Los pacientes con FH no tienen receptores de LDL o los que tienen no son funcionales por lo que el hígado no puede incrementar la captación de la LDL sanguínea. Se reduce la síntesis pero ello no tiene un efecto espectacular sobre el colesterol sanguíneo.



18



METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS

Marguerite W. Coomes

18.1 VISIÓN GENERAL 780

18.2 INCORPORACIÓN DEL NITRÓGENO EN LOS AMINOÁCIDOS 781

La mayor parte de los aminoácidos se obtienen de la dieta 781
Los grupos amino se transfieren desde un aminoácido para formar otro 782
El piridoxal fosfato es el cofactor de las aminotransferasas 783
La glutamato deshidrogenasa incorpora y produce amoníaco 784
El amoníaco libre se incorpora a la glutamina, y es producido a partir de ésta 784
El grupo amida de la asparagina proviene de la glutamina 785
Las aminoácido oxidasas eliminan grupos amino 786

18.3 TRANSPORTE DE NITRÓGENO AL HÍGADO Y RIÑÓN 786

Las proteínas se degradan constantemente 786
Los aminoácidos son transportados desde el músculo después de la proteólisis 787
El amoníaco se libera en el hígado y el riñón 787

18.4 CICLO DE LA UREA 787

Los átomos de nitrógeno de la urea provienen del amoníaco y del aspartato 787
La síntesis de la urea requiere cinco enzimas 788
La síntesis de la urea está regulada por un efector alostérico y por inducción enzimática 789
Los trastornos metabólicos de la síntesis de la urea tienen consecuencias graves 789

18.5 SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS INDIVIDUALES 790

El glutamato es un precursor del glutatión y del γ-aminobutirato 790
La arginina también se sintetiza en los intestinos 791
Ornitina y prolina 792
Serina y glicina 793
El tetrahidrofolato es un cofactor en algunas reacciones de aminoácidos 794
Treonina 797
Fenilalanina y tirosina 797
El metabolismo de la tirosina produce fumarato y acetoacetato 798
La dopamina, adrenalina y noradrenalina son derivados de la tirosina 799
La tirosina está involucrada en la síntesis de la melanina, la hormona tiroidea y las quinoproteínas 801
Metionina y cisteína 803
La metionina reacciona primero con la adenosina trifosfato 803
La *S*-adenosilmetionina es un dador de grupos metilo 805
La *S*-adenosilmetionina es el precursor de la espermidina y la espermina 806
El metabolismo de la cisteína produce compuestos que contienen azufre 807
Triptófano 808
El triptófano es un precursor del NAD 808
El piridoxal fosfato tiene un papel fundamental en el metabolismo del triptófano 810
La quinurenina da lugar a neurotransmisores 810
La serotonina y la melatonina son derivados del triptófano 810
El triptófano induce el sueño 811
Aminoácidos de cadena ramificada 811
Las reacciones iniciales del metabolismo de los BCAA son comunes 811
Las rutas del metabolismo de valina e isoleucina son similares 811
La ruta de la leucina difiere de las de los otros dos aminoácidos de cadena ramificada 811
El propionil CoA se metaboliza a succinil CoA 812
Lisina 812
La carnitina proviene de la lisina 815
Histidina 816
El formiminoglutamato en orina aumenta en la deficiencia de folato 817
La histamina, carnosina y anserina son producidas a partir de la histidina 817
Creatina 818
Glutatión 818
El glutatión se sintetiza a partir de tres aminoácidos 819
El ciclo del γ-glutamilo transporta aminoácidos 819
La concentración de glutatión afecta a la respuesta a toxinas 820

BIBLIOGRAFÍA 821
PREGUNTAS 821
RESPUESTAS 823
APLICACIONES CLÍNICAS
18.1 Deficiencias de carbamil fosfato sintetasa y *N*-acetilglutamato sintetasa 790
18.2 Deficiencias en enzimas del ciclo de la urea 791
18.3 Hiperglicinemia no cetótica 795
18.4 Deficiencia de ácido fólico 797
18.5 Fenilcetonuria 799
18.6 Enfermedades del metabolismo de la tirosina 801
18.7 Enfermedad de Parkinson 801
18.8 Hiperhomocisteinemia y aterogénesis 805
18.9 Otras enfermedades del metabolismo de los aminoácidos sulfurados 805
18.10 Enfermedades del metabolismo de los aminoácidos ramificados 813
18.11 Enfermedades del metabolismo del propionato y del metilmalonato 814
18.12 Enfermedades que implican a la lisina y la ornitina 816
18.13 Histidinemia 816
18.14 Enfermedades del metabolismo del folato 817

18.1 VISIÓN GENERAL

En el Capítulo 3 se trató de los aminoácidos y la relación entre su estructura y la estructura y función de las proteínas. En este capítulo se describe el metabolismo de los aminoácidos y se destaca la importancia de las proteínas de la dieta como fuente principal de aminoácidos para los seres humanos.

El nitrógeno molecular, N_2, es muy abundante en la atmósfera. Antes de poder ser utilizado por los animales debe ser "fijado", esto es, reducido de N_2 a NH_3 por microorganismos, plantas y descargas eléctricas de rayos. El amoníaco es incorporado entonces a los aminoácidos y proteínas, y éstos pasan a formar parte de la cadena alimentaria (Figura 18.1). El hombre sólo puede sintetizar 11 de los 20 aminoácidos necesarios para la síntesis de las proteínas. Aquellos aminoácidos que no

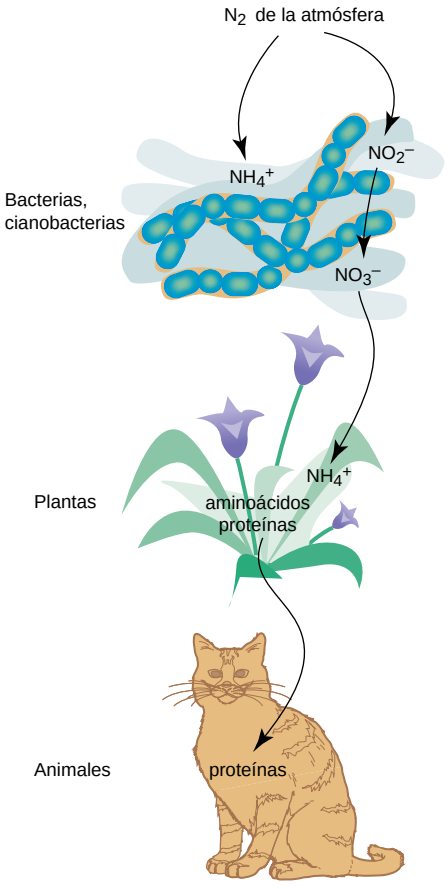


FIGURA 18.1
Esquema de la entrada del nitrógeno en la dieta humana.
La entrada tiene lugar inicialmente por la reducción del nitrógeno a amoníaco por enzimas de microorganismos y plantas.

TABLA 18.1

Esenciales	*No esenciales*
Arginina[a]	Alanina
Histidina	Aspartato
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Cisteína
Lisina	Glutamato
Metionina[b]	Glutamina
Fenilalanina[c]	Glicina
Treonina	Prolina
Triptófano	Serina
Valina	Tirosina

[a]La arginina se sintetiza en los tejidos de los mamíferos, pero a una velocidad insuficiente para satisfacer las necesidades del aminoácido durante el crecimiento.
[b]La metionina se necesita en grandes cantidades para producir cisteína, en caso de que ésta no sea suministrada adecuadamente a través de la dieta.
[c]Se necesitan grandes cantidades de fenilalanina para formar tirosina, en caso de que ésta no sea suministrada adecuadamente a través de la dieta.

pueden ser sintetizados *de novo* son denominados "**esenciales**", ya que deben obtenerse de los alimentos de la dieta que los contienen (Tabla 18.1).

En este capítulo se tratará de las interconversiones entre aminoácidos, la eliminación y excreción de amoníaco y la síntesis de los aminoácidos "no esenciales" por el organismo. Se tratará, como parte del metabolismo del amoníaco, la síntesis y degradación de glutamato, glutamina, aspartato, asparagina, alanina y arginina. Se describirá a continuación la síntesis y degradación de otros aminoácidos no esenciales, así como la degradación de los aminoácidos esenciales. Se presentarán también las rutas sintéticas de derivados de aminoácidos y algunas enfermedades del metabolismo de los aminoácidos.

Los átomos de carbono de los aminoácidos entran en el metabolismo intermediario en alguno de siete puntos diferentes. Los aminoácidos glucogénicos son metabolizados a piruvato, 3-fosfoglicerato, α-cetoglutarato, oxalacetato, fumarato o succinil CoA. Los aminoácidos cetogénicos producen acetil CoA o acetoacetato. El metabolismo de algunos aminoácidos conduce a más de uno de los compuestos anteriores, y son por tanto a la vez glucogénicos y cetogénicos (Figura 18.2). Los productos del metabolismo de los aminoácidos pueden ser utilizados para proporcionar energía. Otros compuestos generadores de energía, normalmente NADH, se producen también durante la degradación de algunos aminoácidos.

18.2 INCORPORACIÓN DEL NITRÓGENO EN LOS AMINOÁCIDOS

La mayor parte de los aminoácidos se obtienen de la dieta

Un adulto sano que ingiera una dieta variada y completa se encuentra generalmente en situación de "**equilibrio nitrogenado**", un estado en el que la cantidad de nitrógeno ingerido cada día es equilibrada por la cantidad excretada, sin que se produzca ningún cambio neto en la cantidad de nitrógeno en el organismo. En condiciones de buena alimentación, el nitrógeno excretado proviene en su mayor parte de la digestión de proteínas en exceso o del recambio normal. El recambio de las proteínas se define como la síntesis y degradación de proteínas. En ciertas condiciones, el organismo está en equilibrio nitrogenado negativo o positivo. En situación de **equilibrio nitrogenado negativo** se excreta más nitrógeno del que se ingiere. Esta situación tiene lugar en la inanición y en ciertas enfermedades. Durante la inanición, las cadenas carbonadas de los aminoácidos son necesarias para la gluconeogénesis; el amoníaco liberado de los aminoácidos es excretado principalmente en forma de urea y no se reincorpora a las proteínas. Una dieta deficiente en un aminoácido esencial conduce también a un equilibrio nitrogenado negativo, al ser degradadas proteínas

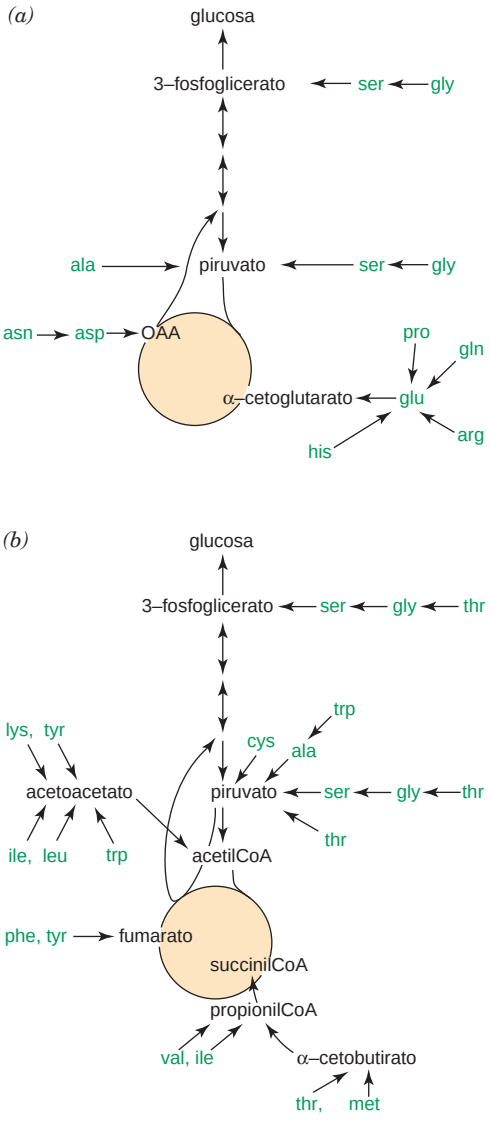


FIGURA 18.2
Destino metabólico de (*a*) los aminoácidos no esenciales; (*b*) los aminoácidos esenciales más cisteína y tirosina.

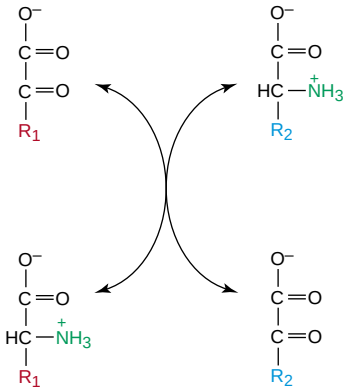


FIGURA 18.3
Reacción de una aminotransferasa.

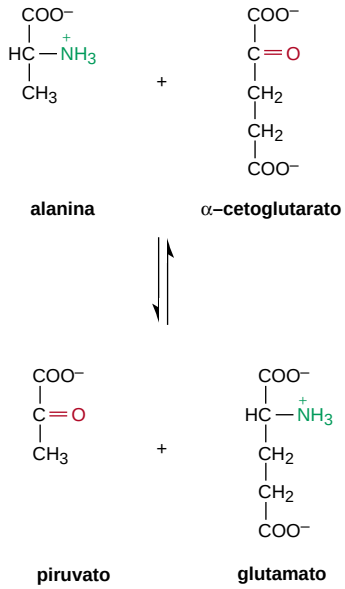


FIGURA 18.4
Reacción de la glutamato–piruvato aminotransferasa.

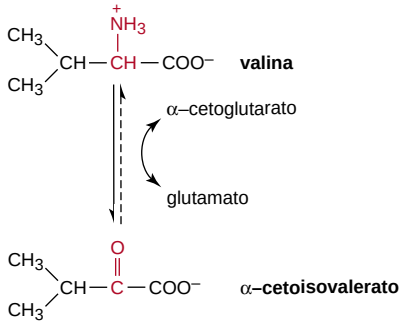


FIGURA 18.5
Transaminación de la valina.
La valina puede formarse a partir del α-cetoisovalerato solamente cuando este compuesto es administrado terapéuticamente.

del organismo para suministrar el aminoácido esencial deficitario y ser metabolizados los restantes 19 aminoácidos liberados. También puede darse un equilibrio nitrogenado negativo durante la vejez. En niños en edad de crecimiento se da una situación de **equilibrio nitrogenado positivo**, puesto que están aumentando su peso corporal e incorporando más aminoácidos en proteínas que las que degradan. La cisteína y la arginina son esenciales en niños, pero no en adultos porque se sintetizan a partir de metionina y ornitina. Estos aminoácidos son fácilmente asequibles para los adultos, pero están limitados en los niños debido a su mayor uso de todos los aminoácidos. Se da también equilibrio nitrogenado positivo durante el embarazo y durante la realimentación después de la inanición.

Los grupos amino se transfieren desde un aminoácido para formar otro

La mayor parte de los aminoácidos utilizados por el organismo para sintetizar proteínas o como precursores de derivados de aminoácidos se obtienen de la dieta o del recambio de las proteínas. Cuando es necesario, los aminoácidos no esenciales se sintetizan a partir de precursores α-cetoácidos a través de la transferencia de un grupo amino ya existente de otro aminoácido. Esta transferencia es realizada por las **aminotransferasas**, denominadas también **transaminasas** (Figura 18.3). La transferencia de grupos amino tiene lugar también durante la degradación de los aminoácidos. En la Figura 18.4 se muestra cómo el grupo amino de la alanina es transferido al α-cetoglutarato para formar glutamato. El piruvato formado suministra átomos de carbono para la gluconeogénesis o para la producción de energía a través del ciclo TCA. Esta reacción es necesaria ya que el amoníaco no puede entrar en el ciclo de la urea directamente desde la alanina, pero sí puede ser donado por el glutamato. La reacción opuesta tendría lugar si hubiera una necesidad de alanina para la síntesis de proteínas que no fuera satisfecha por el aporte de la dieta o por el recambio proteico. La transaminación que involucra aminoácidos esenciales es normalmente unidireccional, puesto que el organismo no puede sintetizar el α-cetoácido equivalente. En la Figura 18.5 se muestra la transaminación de la valina, un aminoácido esencial. El α-cetoisovaleriato resultante es metabolizado a continuación a succinil CoA, en la forma descrita en la p. 814. La transaminación es la reacción más común de los aminoácidos libres, y únicamente la treonina y la lisina no participan en una reacción de aminotransferasa. En estas reacciones, el par aminoácido-α-cetoácido formado por el glutamato y el α-cetoglutarato constituye un par obligado. Esto significa que la transferencia de un grupo amino entre la alanina y el aspartato ha de tener lugar a través de reacciones acopladas, con un glutamato como intermediario (Figura 18.6). La constante de equilibrio de las aminotransferasas es cercana a la unidad, de forma que las reacciones son totalmente reversibles. Cuando la excreción de nitrógeno está impedida y tiene lugar **hiperamonemia**, como por ejemplo en fallos hepáticos, los aminoácidos, incluidos los esenciales, pueden ser reemplazados en la dieta por los α-cetoácidos análogos, con excepción de la treonina y lisina tal como se ha mencionado anteriormente. Los α-cetoácidos son transaminados por aminotranferasas para producir los diferentes aminoácidos. En la Figura 18.5 se muestra la formación de valina después de la administración de α-cetoisovalerato como terapia para la hiperamonemia.

La distribución de algunas aminotransferasas en los tejidos se utiliza en diagnóstico midiendo la liberación de un enzima específico durante una lesión tisular; por ejemplo, la presencia de glutamato aspartato aminotransferasa en plasma es una señal de lesión hepática (véase la p. 452).

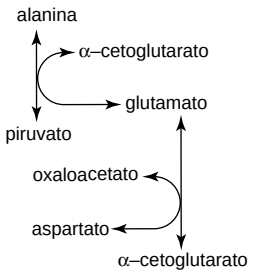


FIGURA 18.6
Una reacción de transaminación acoplada.

El piridoxal fosfato es el cofactor de las aminotransferasas

La transferencia de grupos amino tiene lugar a través de intermediarios asociados al enzima que provienen del **piridoxal fosfato**, la forma funcional de la vitamina B_6 (Figura 18.7). El centro activo de la aminotransferasa "en reposo" contiene piridoxal fosfato unido covalentemente a un grupo ***ε***-amino de un residuo de lisina que forma parte de estructura primaria de la transferasa (Figura 18.8). El complejo está estabilizado además por interacciones iónicas e hidrofóbicas. El enlace, —CH═N—, se denomina **base de Schiff**. El carbono proviene del grupo aldehído del piridoxal fosfato, y el nitrógeno es donado por el residuo de lisina. Cuando un aminoácido sustrato, a punto para ser metabolizado, se aproxima al centro activo, su grupo amino desplaza el grupo ***ε***-amino de la lisina y se forma un enlace de tipo base de Schiff con el grupo amino del aminoácido sustrato (Figura 18.9). En este punto, la molécula derivada del piridoxal fosfato ya no está unida covalentemente al enzima, sino que está sujeta en el centro activo solamente por interacciones iónicas e hidrofóbicas. El enlace tipo base de Schiff en el que interviene el aminoácido sustrato está en equilibrio tautomérico entre una aldimina, —CH═N—CHR_2, y una cetimina, —CH_2—N═CR_2. La hidrólisis de la cetimina libera un ***α***-cetoácido y deja un grupo amino como parte de la estructura de la piridoxamina. El proceso inverso es ahora posible; un ***α***-cetoácido reacciona con el grupo amino, se desplaza el doble enlace, y luego la hidrólisis libera un aminoácido. El piridoxal fosfato vuelve a formar entonces la base de Schiff con el enzima "en reposo" (Figura 18.8). Muchas reacciones que necesitan piridoxal fosfato implican transaminación, pero la capacidad de la base de Schiff de transferir electrones entre átomos diferentes permite que el cofactor participe en la eliminación de otros grupos, tales como los carboxilos. En la Figura 18.10 se muestra la reacción de una **descarboxilasa dependiente de piridoxal fosfato** y una **eliminación *α*, *β***. La concentración efectiva de vitamina

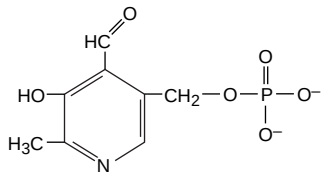


FIGURA 18.7
Piridoxal fosfato.

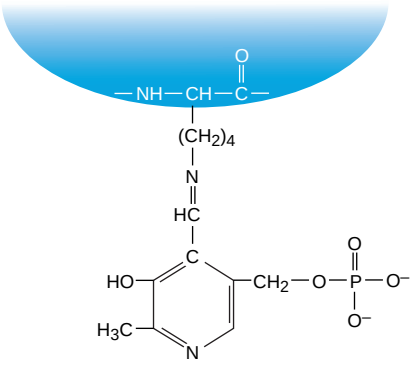


FIGURA 18.8
Piridoxal fosfato unido a un residuo de lisina de una proteína a través de un enlace de tipo aldimina.

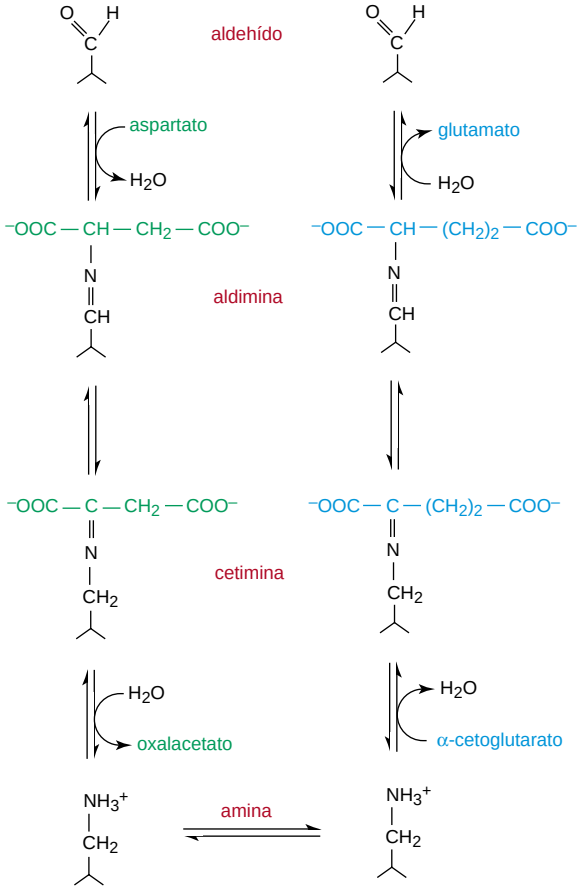


FIGURA 18.9
Las diferentes formas del piridoxal fosfato durante una reacción de transaminación.

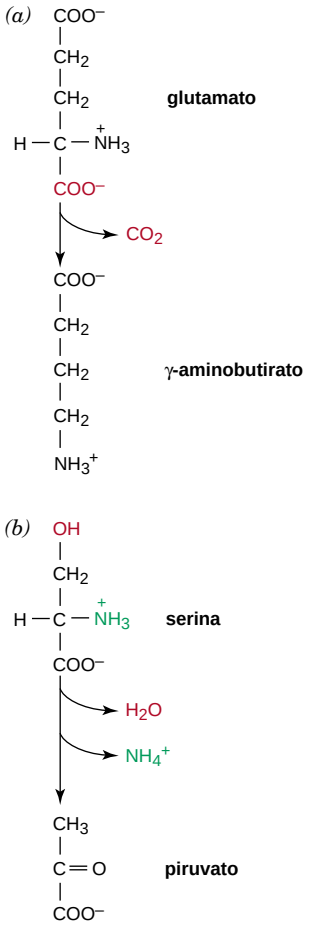
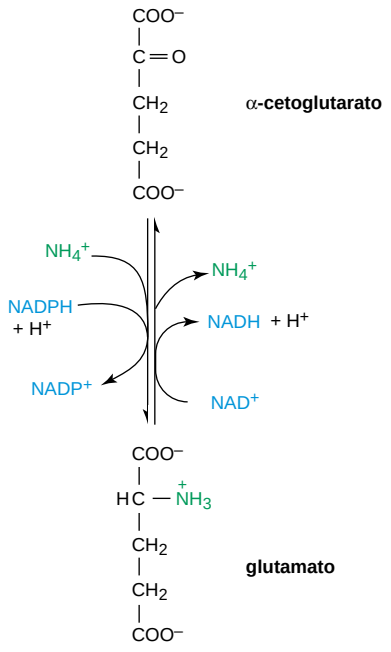


FIGURA 18.10
Las reacciones de la glutamato descarboxilasa y de la serina deshidratasa son reacciones dependientes de piridoxal fosfato.



FFIGURA 18.11
Reacción de la glutamato deshidrogenasa.

B_6 en el organismo puede verse disminuida por la administración de ciertos fármacos, como por ejemplo el antituberculoso isoniazida, que forma una base de Schiff con el piridoxal, haciéndolo inasequible para la catálisis.

La glutamato deshidrogenasa incorpora y produce amoníaco

En el hígado, el amoníaco se incorpora en el glutamato por la **glutamato deshidrogenasa** (Figura 18.11). Este enzima también cataliza la reacción inversa. El glutamato siempre sirve como uno de los aminoácidos en las transaminaciones y es por tanto la "puerta de acceso" entre el amoníaco libre y los grupos amino de la mayor parte de los aminoácidos (Figura 18.12). En la reacción de síntesis se utiliza NADPH, mientras que en la liberación de amoníaco, una reacción de degradación, se utiliza NAD^+. El enzima produce amoníaco a partir de aminoácidos cuando éstos son necesarios como precursores de glucosa o para producir energía. La formación de NADH durante la desaminación oxidativa constituye un extra muy apreciado, puesto que puede ser reoxidado por la cadena respiratoria, con la consiguiente formación de ATP. En la forma mostrada, la reacción es fácilmente reversible en el laboratorio, pero es probable que *in vivo* tenga lugar más frecuentemente en la dirección de la formación de amoníaco. La concentración de amoníaco que sería necesaria para que la reacción produjera glutamato es tóxica y, en condiciones normales, sería raramente alcanzada, exceptuando en la región perivenosa del hígado. Una importante fuente de amoníaco es el **metabolismo bacteriano** en la luz del intestino. El amoníaco liberado es absorbido y transportado al hígado. La glutamato deshidrogenasa incorpora este amoníaco, así como el producido localmente, al glutamato. El papel predominante de este enzima en la eliminación del amoníaco queda subrayado por su localización en las mitocondrias del hígado en donde tienen lugar las reacciones iniciales del ciclo de la urea.

La glutamato deshidrogenasa está regulada alostéricamente por los nucleótidos purínicos. Cuando es necesaria la oxidación de aminoácidos para la producción de energía, la actividad en la dirección de la degradación del glutamato es incrementada por el ADP y GDP, que son indicativos de un estado de bajo nivel de energía en la célula. El GTP y ATP, indicativos de un nivel de energía alto, son activadores alostéricos en la dirección de la síntesis del glutamato (Figura 18.13).

El amoníaco libre se incorpora a la glutamina, y es producido a partir de ésta

El amoníaco libre es tóxico, por lo que en la sangre es transportado preferentemente en forma de grupos amina o amida. El cincuenta por ciento de los aminoácidos circulantes está constituido por **glutamina**, un transportador de amoníaco. El grupo amida de la glutamina es un dador de nitrógeno para varias clases de moléculas entre las que se cuentan las bases purínicas y el grupo amino de la citosina. El glutamato y el amoníaco son los sustratos de la **glutamina sintetasa** (Figura 18.14). Es necesario ATP para activar el grupo α-carboxilo para que la reacción sea energéticamente favorable.

La eliminación del grupo amida es catalizada por la **glutaminasa** (Figura 18.15), de la que existen isozimas específicos de tejidos. La glutaminasa I mitocondrial de riñón e hígado necesita fosfato para su actividad. El hígado contiene glutamina sintetasa y glutaminasa pero no es ni un consumidor ni un productor neto de gluta-

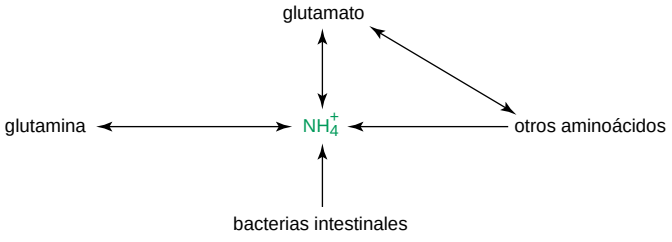


FIGURA 18.12
Papel del glutamato en la síntesis, degradación e interconversión de los aminoácidos.

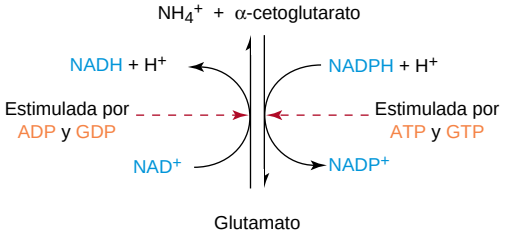


FIGURA 18.13
Regulación alostérica de la glutamato deshidrogenasa.

mina. Los dos enzimas están confinados a las células del parénquima, en diferentes segmentos del hígado. La región periportal está en contacto con la sangre que proviene del músculo esquelético y contiene glutaminasa (y los enzimas del ciclo de la urea). Las células del área perivenosa, que representan el 5% de las células del parénquima, contienen glutamina sintetasa; la sangre fluye de esta área hacia el riñón. Este "**ciclo intercelular de la glutamina**" (Figura 18.16) puede ser un mecanismo para recoger y eliminar el amoníaco que no ha sido incorporado en la urea. Los enzimas de la síntesis de la urea se encuentran en las mismas células periportales que la glutaminasa, mientras que la captación de glutamato y α-cetoglutarato para la síntesis de glutamina predomina en la región perivenosa. El ciclo de la glutamina permite controlar el flujo de amoníaco bien hacia la urea, bien hacia la glutamina, y por tanto hacia la excreción de amoníaco por el riñón en diferentes condiciones de pH.

El grupo amida de la asparagina proviene de la glutamina

El grupo amida de la **asparagina** proviene del de la glutamina (Figura 18.17), y no del amoníaco libre como en la síntesis de la glutamina. Es necesario ATP para activar el grupo α-carboxilo receptor. La asparagina es sintetizada fácilmente en la ma-

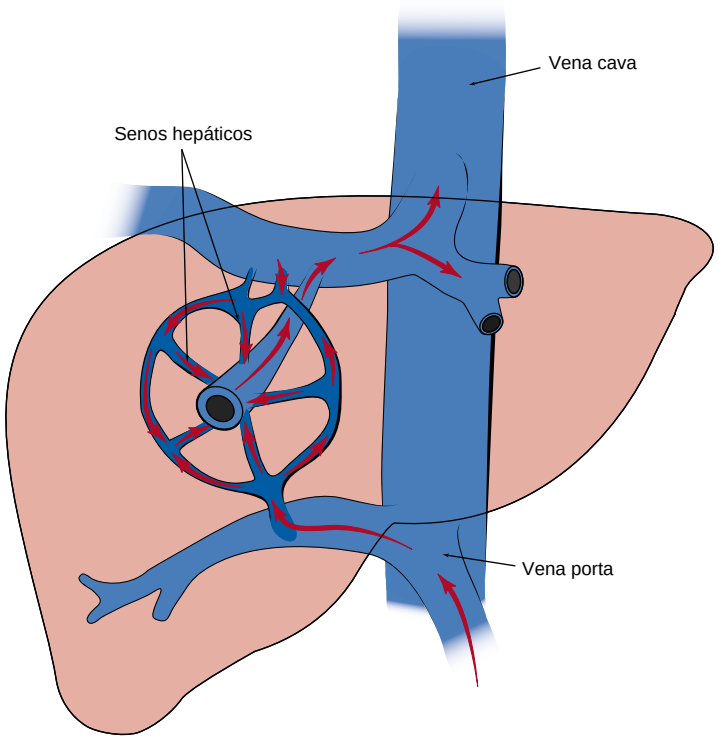


FIGURA 18.16
Ciclo intercelular de la glutamina.
Las células periportales rodean los vasos sanguíneos entrantes mientras que las células perivenosas rodean los vasos sanguíneos salientes.

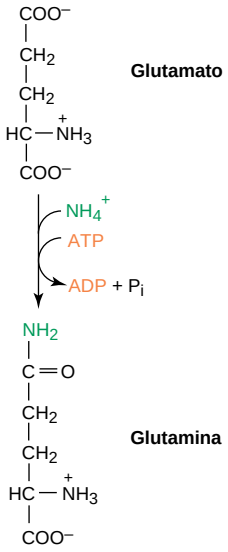


FIGURA 18.14
Reacción catalizada por la glutamina sintetasa.

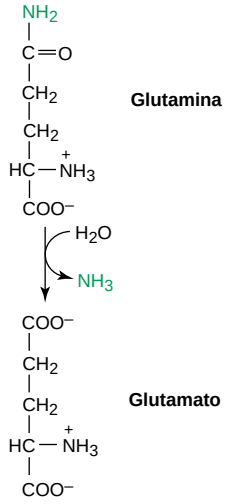


FIGURA 18.15
Reacción catalizada por la glutaminasa.

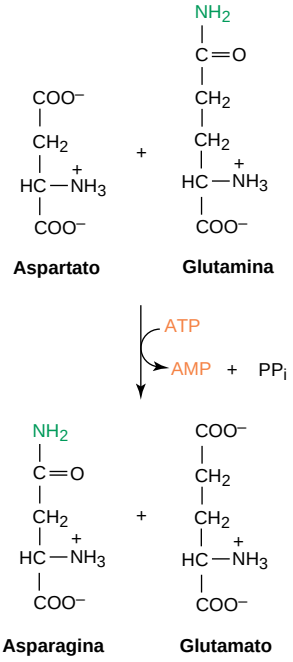


FIGURA 18.17
Síntesis de la asparagina.

yoría de las células, pero algunas células leucémicas parecen haber perdido esta capacidad. Un enfoque terapéutico que ha sido ensayado en pacientes con tumores deficientes en **asparagina sintetasa** es el tratamiento con **asparaginasa** exógena con el fin de hidrolizar la asparagina transportada en la sangre, de la que dependen estas células (Figura 18.18). Las células normales sintetizan y degradan la asparagina.

Las aminoácido oxidasas eliminan grupos amino

Muchos aminoácidos son sustratos de la L-aminoácido oxidasa (Figura 18.19). La importancia de esta reacción en el metabolismo de los aminoácidos no se conoce con exactitud, pero parece ser poco importante. El enzima contiene flavina mononucleótido (FMN) y produce peróxido de hidrógeno. Una vez que el peróxido de hidrógeno se reduce a agua los productos finales son un α-cetoácido, amoníaco y agua, los mismos productos que los de la reacción de la glutamato deshidrogenasa. En la reacción de la aminoácido oxidasa, a diferencia de la reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa, no hay formación concomitante de NADH, y por tanto no hay producción de ATP.

En las células humanas existe también una **D-aminoácido oxidasa**. En el cuerpo humano existen cantidades muy pequeñas de isómeros D de aminoácidos, y el papel de la D-aminoácido oxidasa puede ser la degradación de los D-aminoácidos derivados de las bacterias intestinales.

18.3 TRANSPORTE DE NITRÓGENO AL HÍGADO Y RIÑÓN

Las proteínas se degradan constantemente

Las células mueren según un patrón regular y programado, proceso conocido como **apoptosis**, y sus moléculas componentes son metabolizadas. Las proteínas individuales también experimentan un recambio regular en condiciones normales. Aunque se han identificado las reacciones implicadas en la degradación intracelular de proteínas, el conocimiento de la regulación de la degradación de proteínas está todavía en sus comienzos. El tiempo de vida media de una proteína puede ser de una hora o menos, como es el caso de la ornitina descarboxilasa, la fosfoquinasa C y la insulina, o de varios meses, como la hemoglobina y las histonas, o tan larga como

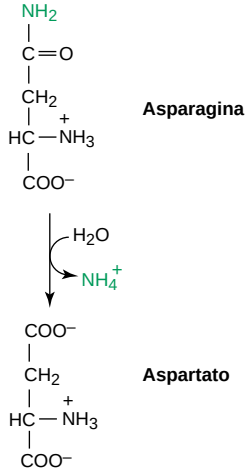


FIGURA 18.18
Reacción catalizada por la asparaginasa.

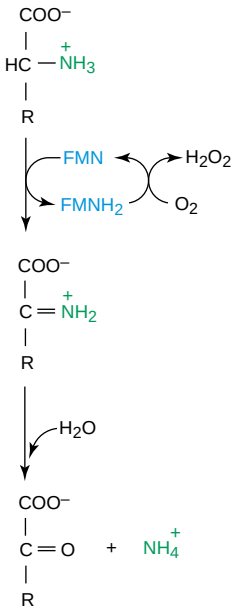


FIGURA 18.19
Reacción de la flavoproteína L-aminoácido oxidasa.

la vida del organismo en el caso del cristalino. La mayoría, sin embargo, son recambiadas en unos pocos días. La selección de una proteína determinada para su degradación no es del todo comprendida pero, en muchos casos, tiene lugar mediante el "marcado" con moléculas unidas covalentemente a una proteína denominada ubiquitina (véase p. 272). La ubiquitina contiene 76 residuos aminoácidos y está unida a través de su residuo C-terminal de glicina al grupo amino terminal y a residuos de lisina de la proteína marcada para su degradación. Este es un proceso no lisosómico, dependiente de ATP, y que requiere un complejo de tres enzimas conocido como **ubiquitina** proteína ligasa. La ubiquitinación y degradación de proteínas participan en la regulación del ciclo celular al influenciar la disponibilidad de proteínas necesarias durante las fases S y G_1. Otros procesos de degradación de proteínas tienen lugar en los lisosomas, o extralisosómicamente a través de enzimas dependientes de calcio.

Los aminoácidos son transportados desde el músculo después de la proteólisis

La mayor parte de las proteínas corporales, y por tanto de los aminoácidos, se encuentran en el músculo esquelético. En condiciones de necesidad de energía, esta proteína es degradada y los grupos amino de los aminoácidos son transferidos a glutamina y alanina y transportados al hígado o al riñón. En el hígado se produce urea y en el riñón amoníaco (a partir de la glutamina) (Figura 18.20). Los esqueletos carbonados son utilizados para producir energía o transportados al hígado para la gluconeogénesis. La proteína muscular responde a condiciones tales como la inanición, traumas, quemaduras y septicemia experimentando una degradación masiva. De los aminoácidos liberados, los de mayor importancia como fuente de energía son los **aminoácidos de cadena ramificada** (valina, leucina e isoleucina). El primer paso en su degradación es la transaminación, que tiene lugar casi exclusivamente en el músculo. Las proteínas son, por supuesto, degradadas en todo el organismo, pero el músculo es con mucho la mayor fuente de aminoácidos libres para el metabolismo.

El amoníaco se libera en el hígado y el riñón

El principal destino de la glutamina y alanina en la sangre es el hígado (véase Figura 18.20). En éste, la alanina aminotransferasa, la glutaminasa y la glutamato deshidrogenasa liberan amoníaco. La glutamato deshidrogenasa no solamente libera amoníaco sino que produce también NADH y α-cetoglutarato, un intermediario glucogénico. En condiciones de necesidad de energía estos productos son muy beneficiosos. Muchos tumores y enfermedades crónicas producen una condición denominada **caquexia**, caracterizada por la desaparición del músculo. Esta desaparición no se debe a la regulación de la degradación de la proteína muscular, sino a un aumento en la velocidad a la que el hígado elimina aminoácidos del plasma, lo que a su vez tiene un efecto potenciador de la proteólisis en el músculo. Cuando la concentración de glucagón circulante es alta (una señal de que es necesario carbono en el hígado para la gluconeogénesis), se potencia también el metabolismo de los aminoácidos estimulando la incorporación de aminoácidos por el hígado.

Parte de la glutamina y alanina es incorporada por el riñón. Los mismos enzimas que son activos en el hígado liberan amoníaco, que es protonado a ion amonio y excretado. Cuando tiene lugar acidosis, el organismo desvía glutamina del hígado al riñón para conservar bicarbonato, ya que la formación de urea, el principal mecanismo de eliminación del NH_4^+, requiere bicarbonato. Para evitar el uso y la excreción de este anión en forma de urea durante la acidosis, se suprime la incorporación de glutamina por el hígado, y se transporta al riñón para su secreción como ion amonio.

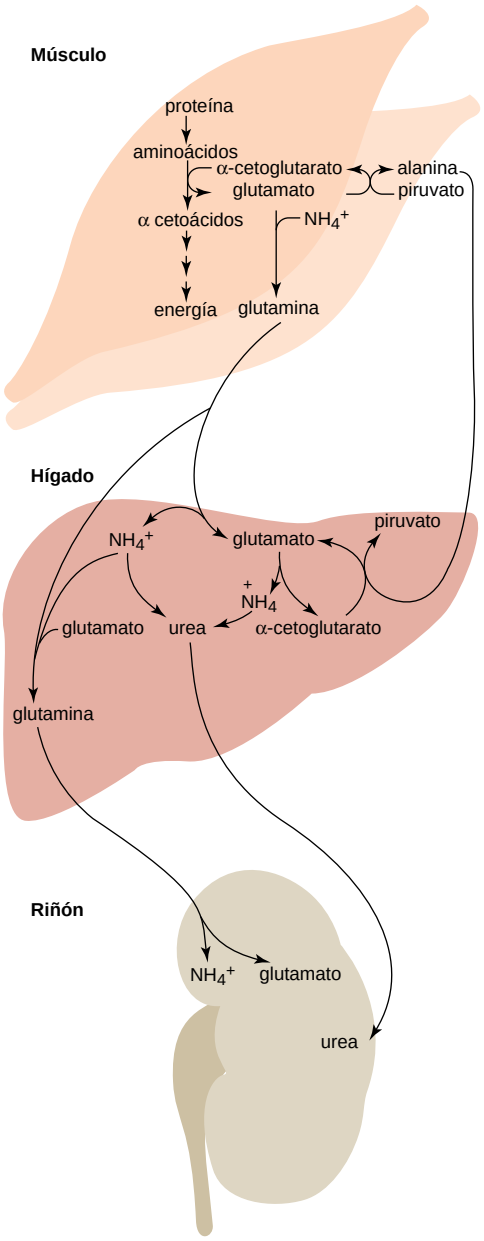


FIGURA 18.20
Rutas principales del transporte del nitrógeno entre órganos después de la proteólisis muscular.

18.4 CICLO DE LA UREA

Los átomos de nitrógeno de la urea provienen del amoníaco y del aspartato

El **ciclo de la urea** y el de los ácidos tricarboxílicos (TCA) fueron descubiertos por Sir Hans Krebs y colaboradores. De hecho, el ciclo de la urea fue descrito antes

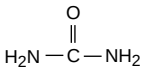


FIGURA 18.21
Urea.

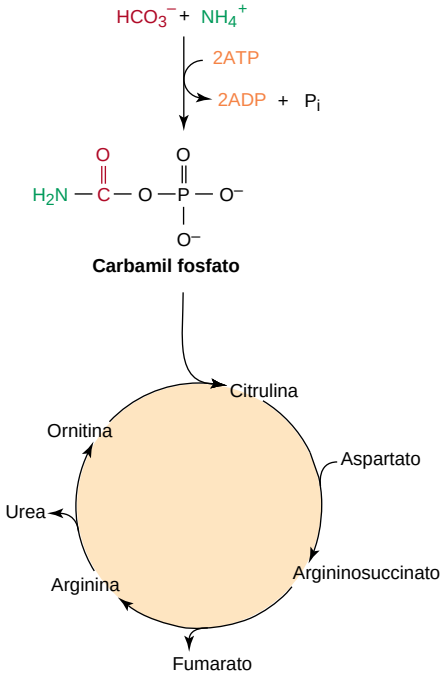


FIGURA 18.22
Síntesis del carbamil fosfato y entrada en el ciclo de la urea.

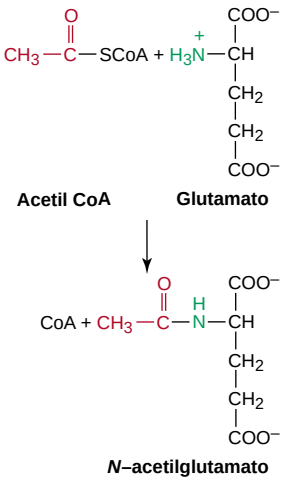


FIGURA 18.23
Reacción catalizada por la *N*-acetilglutamato sintetasa.

que el ciclo TCA. En los mamíferos terrestres el ciclo de la urea es el mecanismo de elección para la excreción del nitrógeno. Los dos nitrógenos de cada molécula de urea (Figura 18.21) provienen de dos fuentes, el amoníaco libre y el grupo amino del aspartato. El ciclo se inicia y finaliza en la **ornitina**. A diferencia del ciclo TCA, en donde los carbonos del oxalacetato al principio son diferentes de los finales, los carbonos de la ornitina final son los mismos que poseía la molécula inicialmente.

El amoníaco (primero de los nitrógenos de la urea) entra en el ciclo después de su condensación con el bicarbonato para formar **carbamil fosfato** (Figura 18.22), que reacciona con la ornitina produciendo **citrulina**. El aspartato (dador del segundo nitrógeno de la urea) y la citrulina reaccionan para formar el **argininosuccinato**, que es escindido a continuación en arginina y fumarato. La arginina es hidrolizada a urea y se regenera la ornitina. La urea es entonces transportada al riñón y excretada en la orina. El ciclo requiere 4 moléculas de ATP por cada molécula de urea formada y excretada. Por tanto, es más eficiente desde el punto de vista energético incorporar amoníaco en aminoácidos que excretarlo. El principal paso regulador es la síntesis inicial del carbamil fosfato, y el ciclo está también regulado por la inducción de los enzimas implicados.

La síntesis de la urea requiere cinco enzimas

La **carbamil fosfato sintetasa I (CPSI)** no es, de hecho, parte del ciclo de la urea, aunque es fundamental para la síntesis de la urea. El ion amonio libre y el bicarbonato se condensan, a expensas de 2 moléculas de ATP, formando el carbamil fosfato. Un ATP activa el bicarbonato y el otro dona el grupo fosfato del carbamil fosfato. La carbamil fosfato sintetasa I se encuentra en la matriz mitocondrial, utiliza amoníaco como dador de nitrógeno, y tiene una total dependencia del ***N*-acetilglutamato** para su actividad (Figura 18.23). Otro enzima con una actividad similar, participa en la biosíntesis de las pirimidinas (véase p. 840). Este enzima, la **carbamil fosfato sintetasa II**, es citosólico, utiliza el grupo amida de la glutamina y no se ve afectado por el *N*-acetilglutamato. Participa en la biosíntesis de pirimidinas (p. 840).

La formación de la citrulina es catalizada por la **ornitina transcarbamilasa** (Figura 18.24) en la matriz mitocondrial. La citrulina es transportada desde las mitocondrias al citosol en donde tienen lugar las restantes reacciones del ciclo de la urea. La producción de argininosuccinato por la **argininosuccinato sintetasa** requiere la hidrólisis de ATP a AMP y PP_i, equivalente a la hidrólisis de dos moléculas de ATP. La rotura del argininosuccinato por la **argininosuccinato liasa** produce fumarato y arginina. La arginina es escindida por la **arginasa** dando ornitina y urea. La ornitina vuelve a entrar en la matriz mitocondrial para iniciar una nueva ronda del ciclo. La membrana mitocondrial interna contiene un **transportador de intercambio citrulina/ornitina**.

La síntesis de ornitina adicional a partir de glutamato para entrar en el ciclo se describirá más adelante. Puesto que la arginina se produce a partir de los carbonos y nitrógenos de la ornitina, amoníaco y aspartato, no es un aminoácido esencial. En niños en edad de crecimiento, sin embargo, cuando existe una incorporación neta de nitrógeno al organismo, es decir un balance de nitrógeno positivo, la síntesis *de novo* de la arginina no resulta adecuada, y este aminoácido se convierte en esencial.

Los átomos de carbono del aspartato, liberados en forma de fumarato, pueden entrar en la mitocondria, y ser metabolizados a oxalacetato por los enzimas del ciclo TCA fumarasa y malato deshidrogenasa, ser transaminados a continuación y entrar en una nueva ronda del ciclo de la urea en forma de aspartato. La mayor parte del oxalacetato (alrededor de dos terceras partes) formado a partir del fumarato es metabolizado a glucosa, vía fosfo*enol*piruvato (Figura 18.25). La cantidad de fumarato utilizada para producir ATP es aproximadamente igual a la requerida para el ciclo de la urea y la gluconeogénesis, lo que significa que el hígado no obtiene una ganancia neta de energía en el proceso del metabolismo de los aminoácidos.

Puesto que el ser humano no puede metabolizar la urea, ésta es transportada al riñón para su filtración y excreción. Si algo de urea penetra en el tracto intestinal, es degradada por las bacterias intestinales que contienen **ureasa**, y el amoníaco resultante es reabsorbido y utilizado por el hígado.

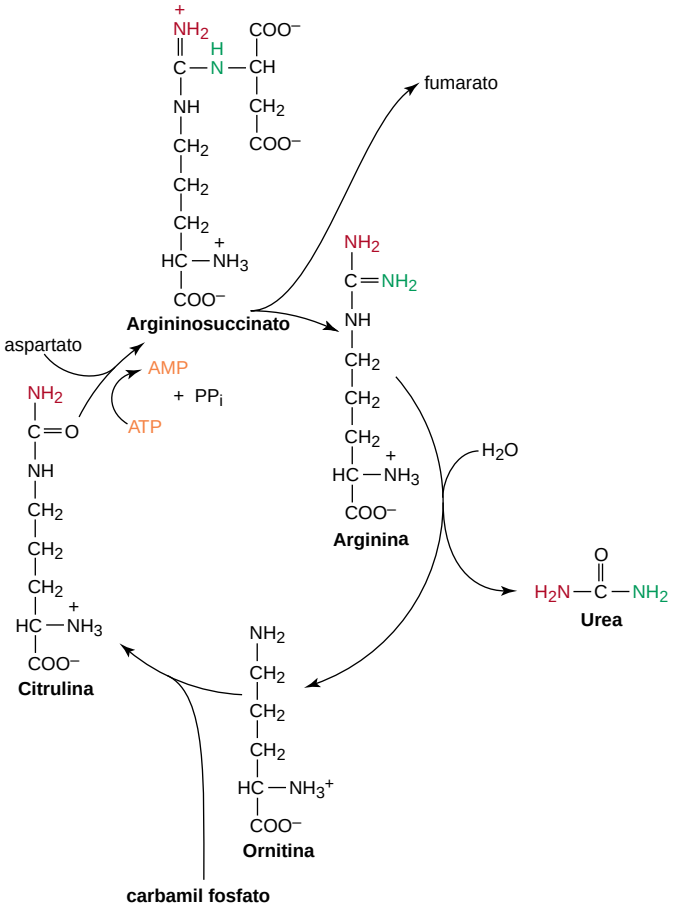


FIGURA 18.24
Ciclo de la urea.

La síntesis de la urea está regulada por un efector alostérico y por inducción enzimática

La carbamil fosfato sintetasa I necesita el activador alostérico ***N*-acetilglutamato** (véase Figura 18.23). Este compuesto es sintetizado a partir de glutamato y acetil CoA por la ***N*-acetilglutamato sintetasa**, que es activada por la arginina. El acetil CoA, el glutamato y la arginina son necesarios para suministrar intermediarios o energía al ciclo de la urea, y la presencia de *N*-acetilglutamato indica que todos ellos están disponibles. Es deseable que una ruta que controla el nivel en plasma del amoníaco, potencialmente tóxico, y que es además altamente dependiente de la energía, esté finamente regulada.

La inducción de los enzimas del ciclo de la urea (de 10 a 20 veces) tiene lugar cuando aumenta el suministro de amoníaco o aminoácidos al hígado. La concentración de los intermediarios del ciclo también desempeña un papel en su regulación a través de la ley de acción de masas. Una dieta alta en proteínas (exceso neto de aminoácidos) o la inanición (necesidad de metabolizar la proteína corporal para suministrar carbonos para la producción de energía), tienen como resultado la inducción de los enzimas del ciclo de la urea.

Los trastornos metabólicos de la síntesis de la urea tienen consecuencias graves

El ciclo de la urea es el principal mecanismo para la utilización y eliminación del amoníaco, una sustancia muy tóxica. Los trastornos metabólicos ocasionados por el funcionamiento anormal de enzimas de la síntesis de la urea son potencialmente fatales y causan estado de coma cuando las concentraciones de amoníaco llegan a ser altas. La pérdida de conciencia puede ser una consecuencia del agotamiento del

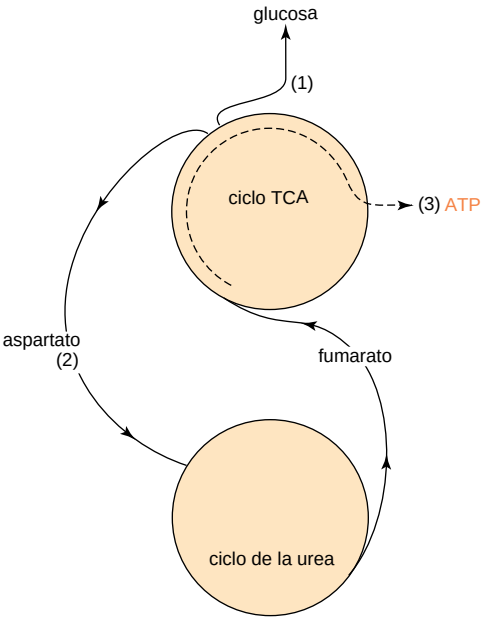


FIGURA 18.25
El fumarato formado en el ciclo de la urea es una fuente de glucosa (1), aspartato (2), o energía (3).

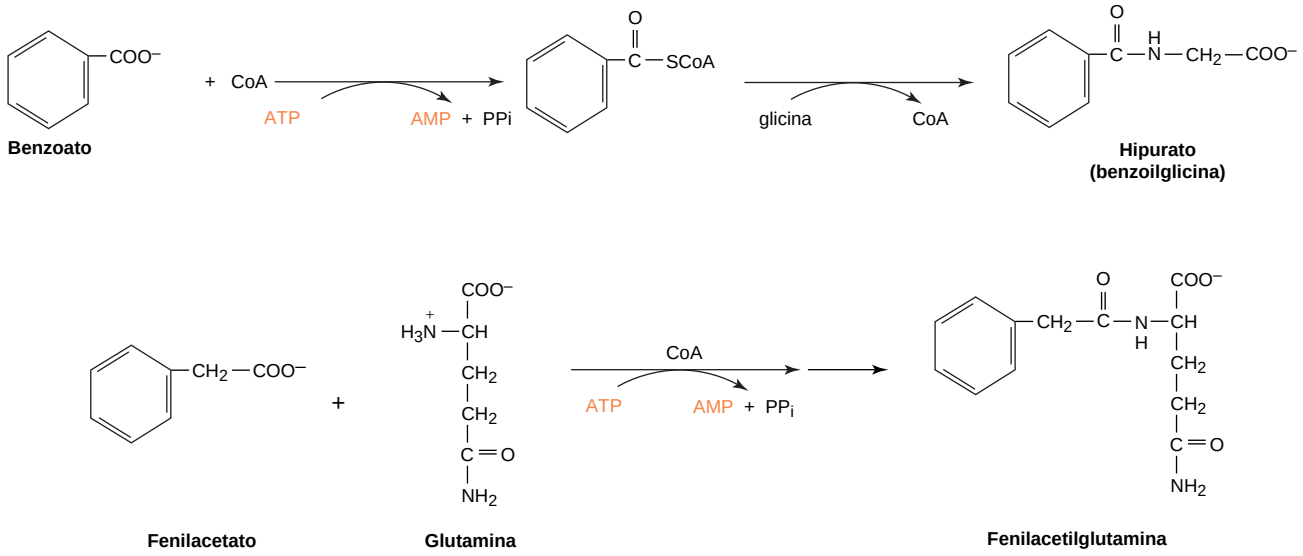


FIGURA 18.26
Reacciones de destoxificación alternativas al ciclo de la urea.

ATP. La principal fuente de ATP es la fosforilación oxidativa, que está ligada a la transferencia de electrones desde el ciclo TCA hasta la cadena de transporte electrónico (véase p. 552). Una concentración alta de amoníaco secuestra el α-cetoglutarato en forma de glutamato, privando de esta manera al ciclo TCA de importantes intermediarios y reduciendo la producción de ATP.

Se han encontrado pacientes con deficiencias en cada uno de los enzimas del ciclo de la urea. La terapia para estos pacientes tiene una triple base: (1) limitar la incorporación de proteína y la acumulación potencial de amoníaco, (2) eliminar el exceso de amoníaco y (3) reemplazar los intermediarios del ciclo de la urea que falten. Lo primero se consigue limitando la ingestión de aminoácidos reemplazándolos, si es necesario, con los α-cetoácidos equivalentes para ser transaminados *in vivo*. La fuente de amoníaco de las bacterias intestinales puede disminuirse mediante un compuesto que acidifique el colon, como por ejemplo la levulosa, un disacárido sintético que se absorbe mal y es metabolizado por las bacterias del colon dando productos ácidos. Esto promueve la excreción del amoníaco en las heces, en forma de iones amonio protonados. También pueden suministrarse antibióticos para destruir las bacterias productoras de amoníaco. El segundo punto se consigue mediante compuestos que se unen covalentemente a los aminoácidos y producen moléculas que contienen nitrógeno y son excretadas en la orina. La Figura 18.26 muestra la condensación del benzoato y la glicina que produce **hipurato**, y del fenilacetato y la glutamina que da **fenilacetilglutamina**. El fenilacetato tiene un sabor sumamente desagradable, y es suministrado en forma del precursor fenilbutirato sódico. Ambas reacciones requieren energía para la activación de los grupos carboxilo por adición de CoA.

Las Aplis. Clíns. 18.1 y 18.2 presentan ejemplos de terapia para deficiencias enzimáticas específicas que, a menudo, incluyen la administración de intermedios del ciclo de la urea.

APLICACIÓN CLÍNICA 18.1

Deficiencias de carbamil fosfato sintetasa y *N*-acetilglutamato sintetasa

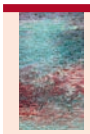
Se ha observado hiperamonemia en niños con niveles de actividad de carbamil fosfato sintetasa en el hígado de entre 0–50% del nivel normal. Además de los tratamientos que se describen en el texto, estos niños han sido tratados con arginina, bajo la hipótesis de que la activación de la *N*-acetilglutamato sintetasa por la arginina estimularía la carbamil fosfato sintetasa residual. Esta deficiencia enzimática conduce generalmente a retraso mental. Se ha descrito un caso de deficiencia de *N*-acetilglutamato sintetasa, que fue tratado con éxito administrando carbamil glutamato, un análogo del N-acetilglutamato, que es también capaz de activar la carbamil fosfato sintetasa.

18.5 | SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS INDIVIDUALES

Se tratan a continuación otros aspectos del metabolismo del glutamato, glutamina, aspartato, asparagina, alanina y arginina. Se describirá la síntesis de otros aminoácidos no esenciales y la degradación de todos los aminoácidos, así como la síntesis de derivados de aminoácidos de importancia fisiológica.

El glutamato es un precursor del glutatión y del γ-aminobutirato

El glutamato es un componente del **glutatión** (véase p. 818) y un precursor del **ácido γ-aminobutírico**, un neurotransmisor (véase p. 1001) (Figura 18.27) y de la prolina y ornitina (véase p. 792).



APLICACIÓN CLÍNICA 18.2
Deficiencias en enzimas del ciclo de la urea

Deficiencia de ornitina transcarbamilasa

La enfermedad de deficiencia enzimática del ciclo de la urea más habitual es la falta de ornitina transcarbamilasa. A menudo ocasiona retraso mental y la muerte, pero en algunas ocasiones se ha constatado un desarrollo normal en pacientes que han sido tratados, lo que sugiere que el retraso mental asociado normalmente a esta enfermedad es provocado por el exceso de amoníaco previo a la aplicación de la terapia adecuada. El gen de la ornitina transcarbamilasa está en el cromosoma X, y la enfermedad afecta más gravemente a los varones que a las mujeres heterocigóticas. Además del incremento de amoníaco y aminoácidos en la sangre, se produce también un aumento de ácido orótico, probablemente a causa de la difusión hacia el citosol del carbamil fosfato que no puede ser utilizado para formar citrulina, donde se condensa con aspartato para convertirse finalmente en orotato (véase p. 840).

Deficiencia de argininosuccinato sintetasa y liasa

La incapacidad de condensar la citrulina con aspartato ocasiona la acumulación de citrulina en la sangre y su excreción en la orina (citrulinemia). La terapia contra esta enfermedad, normalmente benigna, requiere un suplemento específico de arginina para la síntesis de proteínas y la formación de creatina. La incapacidad de romper el argininosuccinato para formar arginina tiene en común con la deficiencia de argininosuccinato sintetasa el hecho de que el sustrato, en este caso el argininosuccinato, se excreta en grandes cantidades. La gravedad de los síntomas de esta enfermedad es muy variable, de manera que es difícil evaluar la efectividad de la terapia, que incluye el suplemento de arginina en la dieta.

Deficiencia de arginasa

La deficiencia de arginasa es una enfermedad rara que provoca muchas anomalías en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central. Se produce una acumulación y excreción de arginina, así como de precursores y productos del metabolismo de este aminoácido. Sorprendentemente, también se excreta algo de urea, lo cual ha sido atribuido a un segundo tipo de arginasa presente en el riñón. Se ha utilizado con éxito una dieta que incluya los aminoácidos esenciales pero que excluya la arginina.

Brusilow, S. W., Danney, M., Waber, L. J., Batshaw, M. Treatment of episodic hyperammonemia in children with inborn errors of urea synthesis. *N. Engl. J. Med.* 310:1630, 1984.

La arginina también se sintetiza en los intestinos

La producción de arginina para la síntesis de proteínas, y no como intermediario en el ciclo de la urea, tiene lugar en el riñón, que no posee arginasa. El principal lugar de síntesis de citrulina para ser utilizada como precursor de arginina es la mucosa intestinal, que posee todos los enzimas necesarios para convertir el glutamato (vía ornitina, tal como se describe más abajo) en citrulina, que es entonces transportada al riñón para producir arginina. La arginina es un precursor del **óxido nítrico** (p. 486); en el cerebro, la **agmatina**, un compuesto que puede tener propiedades antihipertensivas, es un derivado de arginina (Figura 18.28).

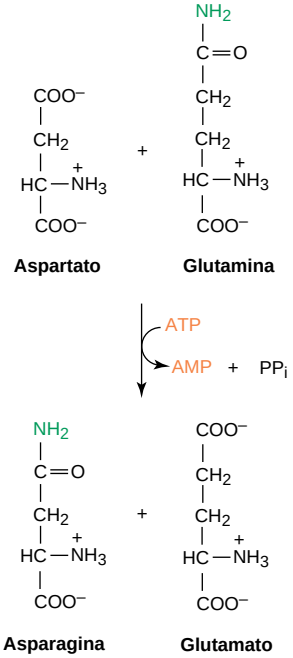


FIGURA 18.27
Síntesis del ácido γ-aminobutírico (GABA).

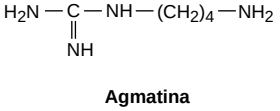


FIGURA 18.28
Agmatina.

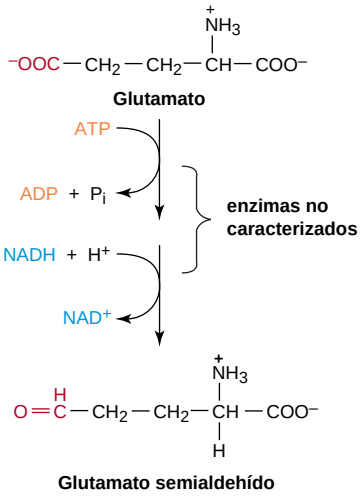


FIGURA 18.29
Síntesis del semialdehído glutámico.

Ornitina y prolina

La **ornitina**, el precursor de la citrulina y de la arginina, y la **prolina** se sintetizan a partir del glutamato y se degradan, por caminos ligeramente diferentes, a glutamato. La síntesis de estos dos aminoácidos no esenciales se inicia a partir del α-cetoglutarato, con una reacción compartida que utiliza ATP y NADH (Figura 18.29) y que conduce al **semialdehído del ácido glutámico**. Éste se cicla espontáneamente y forma una base de Schiff entre los grupos aldehído y amino que a continuación es reducida por el NADPH a prolina. El semialdehído del ácido glutámico puede experimentar una transaminación del grupo aldehído, que evita la ciclación, y se convierte en ornitina (Figura 18.30).

La prolina puede ser convertida de nuevo al intermediario de tipo base de Schiff, Δ^1-pirrolina 5-carboxilato, que está en equilibrio con el semialdehído del ácido glutámico. La reacción de transaminación de la ruta sintética de la ornitina es libremente reversible y forma semialdehído glutámico a partir de la ornitina (Figura 18.30). Los residuos de prolina pueden ser hidroxilados tras su incorporación a una proteína formando **3-** o **4- hidroxiprolina** (Figura 18.31). Cuando estos residuos son liberados por la degradación de la proteína y metabolizados producen glioxalato y piruvato, y 4-hidroxi-2-cetoglutarato, respectivamente.

La ornitina es un precursor de la putrescina, la molécula base de las poliaminas, moléculas altamente catiónicas que interaccionan con el DNA. La ornitina descarboxilasa cataliza esta reacción (Figura 18.32). Este enzima está regulado por fosforilación en varios sitios, presumiblemente en respuesta a hormonas o factores de crecimiento específicos, o a señales de regulación del ciclo celular. Puede también ser inducido, y ésta es a menudo la primera señal fácilmente medible de que la división celular es inminente, ya que las poliaminas deben ser sintetizadas antes de que pueda tener lugar la mitosis. Otras **poliaminas** comunes son la **espermidina** y la **espermina** (véase Figura 18.59), que son sintetizadas a partir de la putrescina por adición de propilamina, un producto del metabolismo de la metionina (véase p. 806).

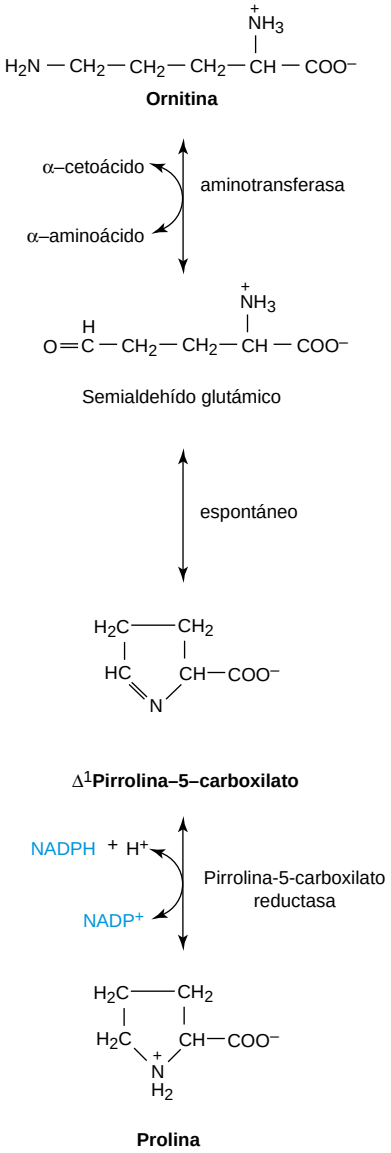


FIGURA 18.30
Síntesis de la ornitina y prolina a partir del semialdehído del ácido glutámico, un intermediario compartido.

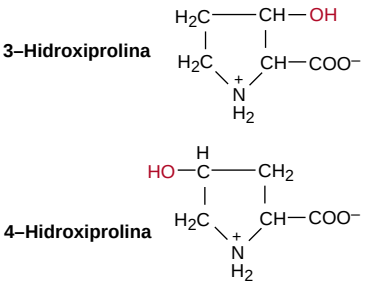


FIGURA 18.31
Hidroxiprolinas.

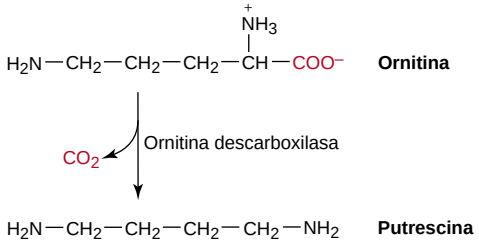
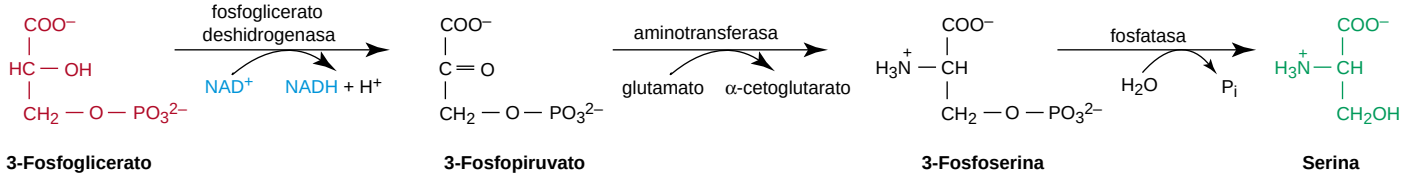


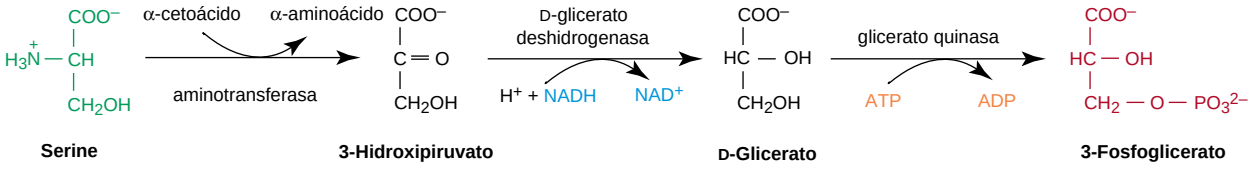
FIGURA 18.32
Descarboxilación de la ornitina a putrescina.
Las estructuras de la espermidina y la espermina se muestran en la Figura 18.59.

Serina y glicina

La **serina** es sintetizada *de novo* a partir del 3-fosfoglicerato proveniente de la ruta glucolítica. Cuando la serina proporciona intermediarios gluconeogénicos, el 3-fosfoglicerato es un intermedio en su degradación, aunque los enzimas e intermediarios en ambas rutas son diferentes. La síntesis de la serina utiliza intermediarios fosforilados empezando en el 3-fosfoglicerato (Figura 18.33*a*); la pérdida de fosfato es el último paso. En la ruta de la serina al 3-fosfoglicerato los intermediarios están desfosforilados y la adición del fosfato es el último paso. Los enzimas que catalizan las reacciones en las dos rutas no son los mismos (Figura 18.33*b*). Otra reacción a través de la cual la serina entra en el metabolismo intermediario es la de la **serina deshidratasa**, que forma piruvato, con pérdida del grupo amino en forma de NH_4^+ (Figura 18.34). El mismo enzima cataliza una reacción similar con la treonina (véase p. 797).



(a) Síntesis de la serina a partir de un intermediario de la glucólisis



(b) Reacciones desde la serina a un intermediario de la gluconeogénesis

FIGURA 18.33
Rutas de (a) síntesis de serina y (b) metabolismo de la serina para la gluconeogénesis.

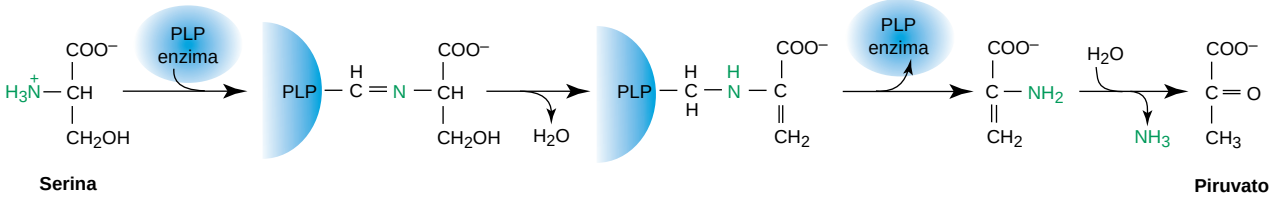


FIGURA 18.34
La reacción de la serina deshidratasa requiere piridoxal fosfato.

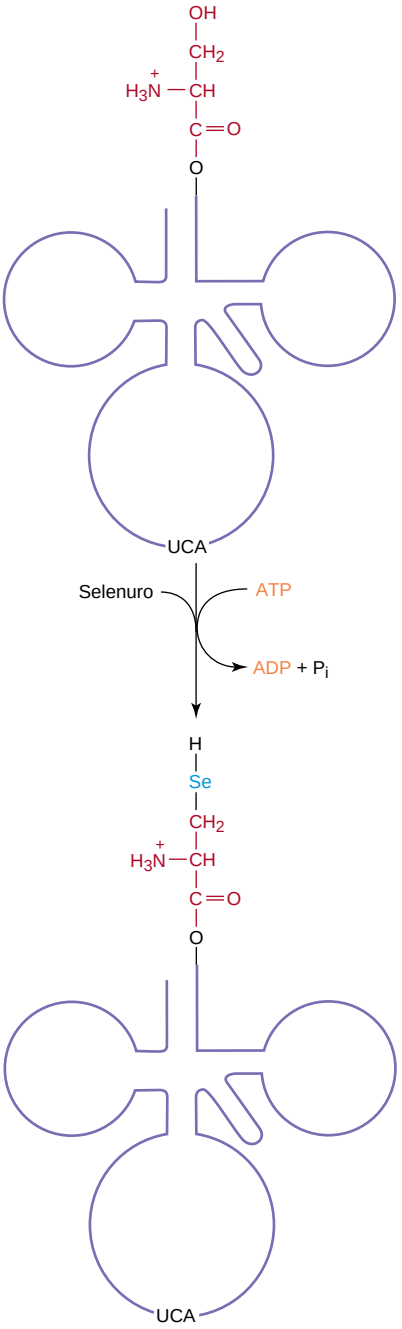


FIGURA 18.35
La formación del selenocisteinil tRNA a partir del seril tRNA tiene lugar a través de un intermediario de tipo fosfoseril tRNA.

La serina es el precursor de un aminoácido poco común pero importante. Algunas proteínas, entre las que destaca la **glutatión peroxidasa**, contienen **selenocisteína** (Figura 18.35). En el mRNA correspondiente a selenoproteínas el codón UGA, que en general sirve como codón de terminación, codifica la selenocisteína. Este aminoácido se forma a partir de la serina después de la formación del complejo seril–tRNA^{Ser}. La etanolamina, colina y betaína (Figura 18.36) son derivados de la serina. Obsérvese que la colina se clasifica actualmente como una vitamina. La **etanolamina** y **colina** son componentes de los lípidos, y la **betaína** es un dador de metilo en una ruta minoritaria que conduce al reciclaje de la metionina (véase p. 806). La serina actúa también como aceptor de un grupo sulfhidrilo de la homocisteína en la síntesis de cisteína (véase p. 804).

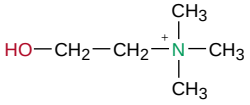
En algunos enzimas un residuo de serina se encuentra modificado para formar un grupo prostético. En el hombre, el único ejemplo descrito hasta el momento es la ***S*-adenosilmetionina descarboxilasa** (que se tratará más adelante en relación a la formación de poliaminas; véase p. 807). El grupo prostético formado es el piruvato. La *S*-adenosilmetionina descarboxilasa se sintetiza en forma de un precursor que sufre una rotura autocatalítica entre un residuo de glutamato y uno de serina y da dos polipéptidos. Durante esta rotura, otras reacciones convierten la nueva serina N-terminal de uno de los péptidos resultantes en un piruvato (Figura 18.37). El piruvato actúa en la descarboxilación formando una base de Schiff con el grupo amino de la *S*-adenosilmetionina.

La serina se convierte de forma reversible en **glicina**, en una reacción que requiere piridoxal fosfato y tetrahidrofolato. Se forma ***N*^{5},*N*^{10}-metilenotetrahidrofolato** (N^5,N^{10}-THF o N^5,N^{10}-H_4 folato) (Figura 18.38). La demanda de serina y glicina y la cantidad de N^5,N^{10}-THF disponible determinan la dirección de esta reacción. La glicina es degradada a CO_2 y amoníaco por el **complejo de rotura de la glicina** (Figura 18.39; véase Apli. Clín. 18.3). La reacción es reversible *in vitro*, pero no *in vivo*, ya que los valores de K_m para el amoníaco y el N^5,N^{10}-THF son mucho mayores que sus respectivas concentraciones fisiológicas.

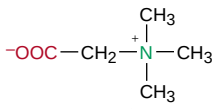
La glicina es el precursor del **glioxalato**, que puede ser transaminado de nuevo a glicina u oxidado a **oxalato** (Figura 18.40). Una producción excesiva de oxalato conduce a la formación de la sal cálcica del oxalato, que es insoluble y puede llevar a la formación de cálculos renales. En la p. 993 se describe el papel de la glicina como neurotransmisor.

El tetrahidrofolato es un cofactor en algunas reacciones de aminoácidos

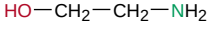
El **tetrahidrofolato** es la forma reducida del ácido fólico, una de las vitaminas B, que a menudo se presenta como un derivado poli-γ-glutamílico (Figura 18.41). El tetrahidrofolato es un **transportador de una unidad monocarbonada**, que facilita la interconversión de grupos metenilo, formilo, formimino, metileno y metilo (Figura 18.42). Esta interconversión tiene lugar a expensas de la reducción u oxidación de un nucleótido piridínico y tiene lugar mientras la porción carbonada está



Colina



Betaína



Etanolamina

FIGURA 18.36
Colina y compuestos relacionados.

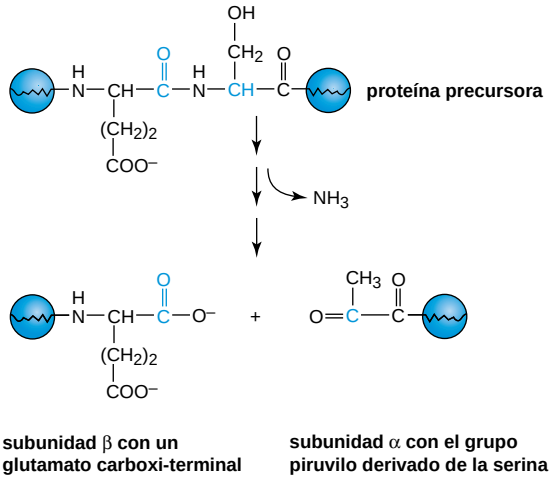


FIGURA 18.37
Formación de un enzima con un grupo prostético piruvilo unido covalentemente.

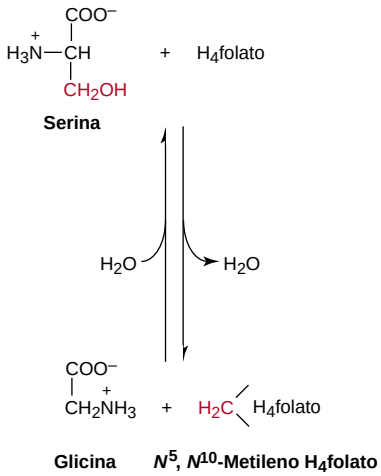


FIGURA 18.38
Serina hidroximetiltransferasa.

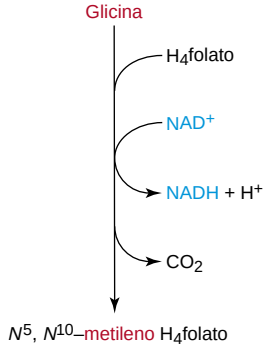


FIGURA 18.39
La rotura de la glicina es dependiente de piridoxal fosfato.

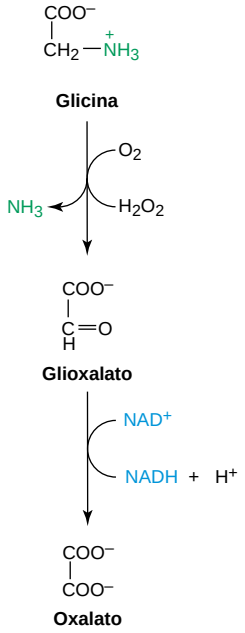


FIGURA 18.40
Oxidación de la glicina.

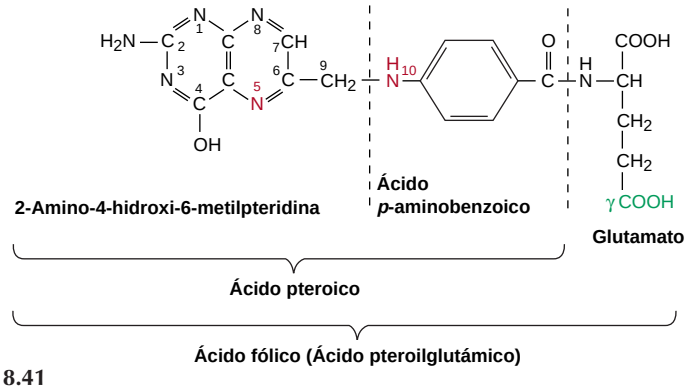
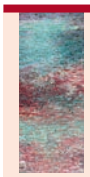


FIGURA 18.41
Componentes del folato.
Puede adicionarse poli-γ-glutamato al grupo γ-carboxilo.



APLICACIÓN CLÍNICA 18.3
Hiperglicinemia no cetótica

La hiperglicinemia no cetótica se caracteriza por una deficiencia mental grave; muchos pacientes no superan la infancia. El nombre de esta grave enfermedad pretende distinguirla de la cetoacidosis en las anomalías del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, en las cuales, y por razones desconocidas, el nivel de glicina en la sangre también es elevado. Se ha demostrado, en homogenados hepáticos de varios pacientes, la deficiencia del complejo de rotura de la glicina, y estudios isotópicos *in vivo* han confirmado que este enzima no es activo en estos pacientes. El complejo de rotura de la glicina consta de cuatro subunidades proteicas diferentes. En tres de ellas se han hallado anormalidades hereditarias. La gravedad de esta enfermedad sugiere que la rotura de la glicina es de gran importancia en el catabolismo de ésta. La glicina es uno de los principales inhibidores de neurotransmisores, lo que probablemente explica algunas de las complicaciones neurológicas de la enfermedad. Medidas vigorosas para la reducción de los niveles de glicina son incapaces de alterar el curso de la enfermedad.

Nyhan, W. L. Metabolism of glycine in the normal individual and in patients with non-ketotic hyperglycinemia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 5:105, 1982.

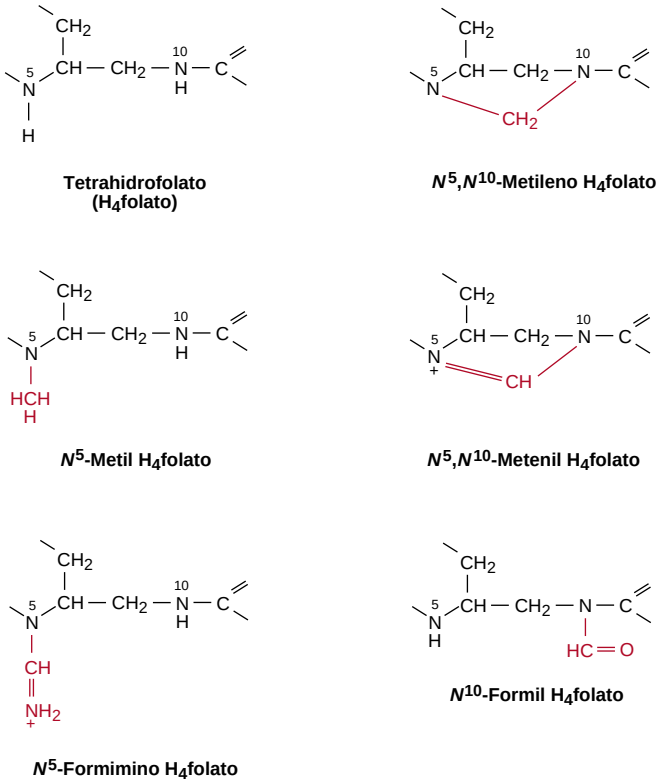


FIGURA 18.42
Centro activo del H_4 folato.
N^5 es el sitio de unión de los grupos metilo; N^{10} es el sitio para formilo y formimino; los grupos metileno y metenilo forman puentes entre N^5 y N^{10}.

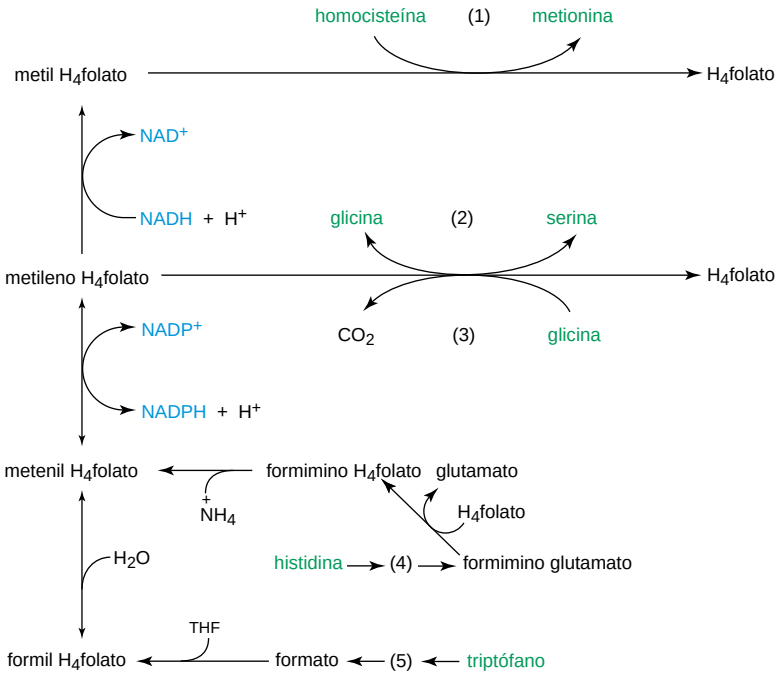


FIGURA 18.43
Interconversión de los derivados de H_4 folato y su papel en el metabolismo de los aminoácidos.
(1) Recuperación de la metionina, (2) serina hidroximetiltransferasa, (3) complejo de rotura de la glicina, (4) degradación de la histidina, y (5) metabolismo del triptófano.

unida al H_4-folato (Figura 18.43). Las formas más oxidadas, formilo y metenilo, se unen al N^{10} del anillo de pteridina, el metileno forma un puente entre los nitrógenos N^5 y N^{10}, y el metilo se une a N^5. Las interconversiones permiten la utilización de un carbono que es eliminado de una molécula en un estado de oxidación para su adición a otra molécula diferente en otro estado de oxidación (Figura 18.42).

En la reducción del puente metileno N^5,N^{10} del tetrahidrofolato a un grupo metilo para su transferencia al anillo de pirimidina (Figura 18.44), una reacción que se da en la **síntesis del timidilato** (véase p. 845), el poder reductor no proviene del nucleótido piridínico sino del propio anillo de pteridina. El dihidrofolato resultante, no tiene función fisiológica y se reduce de nuevo a tetrahidrofolato por una dihidrofolato reductasa dependiente de NADPH (véase Apli. Clín. 18.4). El resultado neto de las dos reacciones es la oxidación del NADPH y la reducción del puente metileno a un grupo metilo, análogo a las reacciones en un paso mostradas en la Figura 18.43.

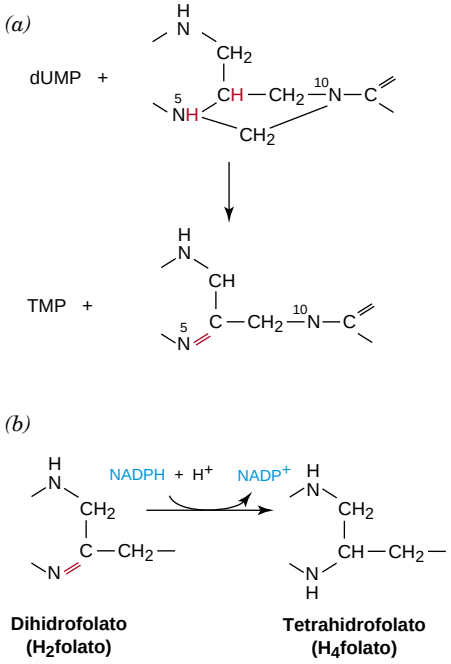


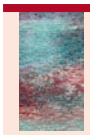
FIGURA 18.44
Reacciones de reducción en las que interviene el H_4 folato.
(*a*) Reducción del grupo metileno del H_4 folato a un grupo metilo y transferencia al dUMP para formar TMP. (*b*) Reducción del dihidrofolato resultante a tetrahidrofolato.

Treonina

La **treonina** se metaboliza normalmente a piruvato (Figura 18.45), pero un intermediario de esta ruta puede sufrir una tiólisis por CoA y producir acetil CoA y glicina. De esta forma, el átomo de carbono α de la treonina puede contribuir a la reserva de unidades monocarbonadas. En una ruta alternativa, pero menos común, la **serina deshidratasa** (véase p. 793), convierte la treonina en α-cetobutirato. Éste es metabolizado a propionil CoA por un complejo similar a la piruvato deshidrogenasa.

Fenilalanina y tirosina

La **tirosina** y la **fenilalanina** se tratan conjuntamente, puesto que la tirosina se produce por hidroxilación de la fenilalanina y es el primer producto de la degradación de ésta. Por esta razón, no se considera habitualmente que la tirosina sea esencial, mientras que la fenilalanina sí lo es. Tres cuartas partes de la fenilalanina ingerida son hidrolizadas a tirosina. Esta conversión está catalizada por la fenilalanina hidroxilasa (Figuras 18.46 y 18.47; Apli. Clín. 18.5), enzima dependiente de tetrahidrobiopterina (Figura 18.48). Esta reacción tiene lugar solamente en la dirección de la formación de la tirosina, y la fenilalanina no puede obtenerse a partir de la tirosina.



APLICACIÓN CLÍNICA 18.4
Deficiencia de ácido fólico

Las dietas normales de los países occidentales suministran fácilmente los 100 a 200 mg de ácido fólico que necesitan diariamente los adultos. No obstante, la deficiencia de ácido fólico no es rara. Esto puede deberse a dietas limitadas, especialmente cuando los alimentos se cocinan a elevadas temperaturas durante largos períodos de tiempo, condiciones en las que la vitamina se destruye. Las enfermedades intestinales, en especial la enfermedad celíaca, vienen a menudo caracterizadas por una deficiencia de ácido fólico provocada por una absorción defectuosa de éste. La incapacidad de absorber ácido fólico es muy rara. La deficiencia de folato se observa habitualmente sólo en los recién nacidos y produce síntomas de anemia megaloblástica. Entre los pocos pacientes estudiados, algunos respondían a elevadas dosis orales de folato, pero uno requerió una administración parenteral; estas observaciones sugieren que la absorción de la vitamina debe ser un proceso mediado por un transportador. Los pacientes con deficiencia de folato muestran, además de la anemia, una sintomatología mental y del sistema nervioso central, y todos ellos responden a una terapia continua, aunque si el tratamiento se retrasa o es inadecuado se pueden producir daños permanentes. Los requerimientos humanos de ácido fólico fueron estudiados, en un experimento clásico, por un médico que fue posiblemente su propio sujeto de experimentación. En este estudio, la dieta consistía exclusivamente en alimentos hervidos repetidamente, con el fin de extraer de ellos las vitaminas hidrosolubles, y a los que se añadían a continuación las vitaminas (y minerales), a excepción del ácido fólico. Los síntomas atribuibles a la deficiencia de folato no aparecieron hasta las 7 semanas de tratamiento con esta dieta. La alteración de las células sanguíneas y la excreción de formiminoglutamato no se observaron hasta las 13 semanas, y los síntomas graves (irritabilidad, pérdida de memoria y anemia macrocítica) no aparecieron hasta después de 4 meses. Los síntomas neurológicos desaparecieron a los dos días de restablecer el ácido fólico en la dieta; el cuadro hematológico recuperó su normalidad más lentamente. La existencia de ácido fólico en prácticamente la totalidad de los alimentos naturales hace que esta deficiencia sea rara; de hecho una persona normal acumula unas cantidades de esta vitamina superiores a las necesarias. La situación es muy diferente para las mujeres embarazadas, ya que entre las necesidades del feto para un crecimiento normal se encuentra el aporte ininterrumpido de coenzimas (además de aminoácidos y otros constituyentes celulares). Recientemente, la deficiencia de folato se ha relacionado con la espina bífida.

Herbert, V. Experimental nutritional folate deficiency in man. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 75:307, 1962.

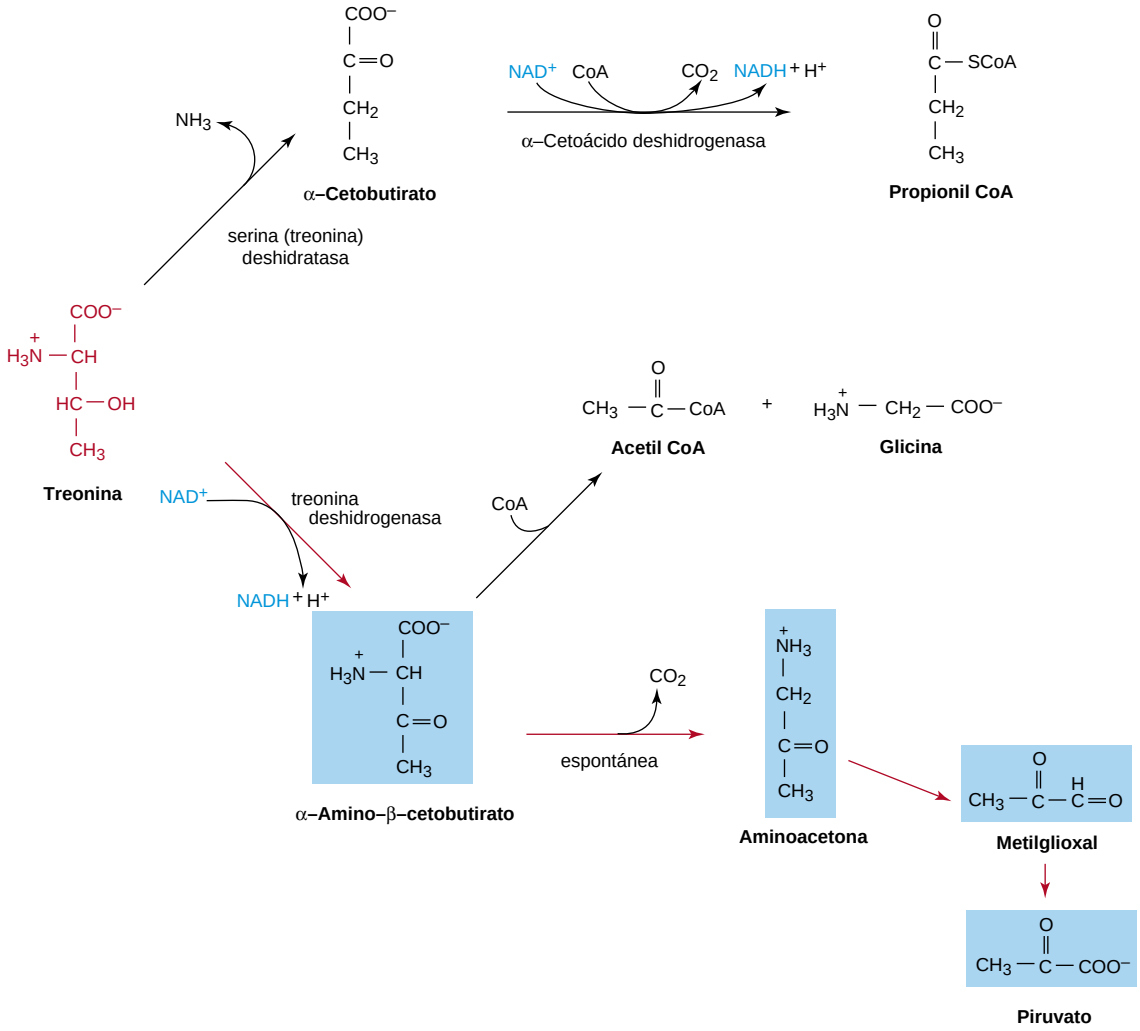


FIGURA 18.45
Esbozo del metabolismo de la treonina.
La ruta principal está indicada en color.

La biopterina, se asemeja al ácido fólico por contener un anillo de pteridina pero no es una vitamina, sino que se sintetiza a partir de GTP (véase Apli. Clín. 18.5)

El metabolismo de la tirosina produce fumarato y acetoacetato

El primer paso en el metabolismo de la tirosina es la transaminación por la **tirosina aminotransferasa** a *p*-hidroxifenilpiruvato (Figura 18.49). El enzima es inducible, y su síntesis es incrementada por los glucocorticoides y la tirosina de la dieta. La ***p*-hidroxifenilpiruvato oxidasa** produce **ácido homogentísico**. Esta compleja reacción implica una descarboxilación, oxidación, migración de la cadena lateral carbonada e hidroxilación. Al menos una de estas actividades requiere ácido ascórbico, pero las cuatro son catalizadas por el mismo enzima. El anillo aromático es escindido a

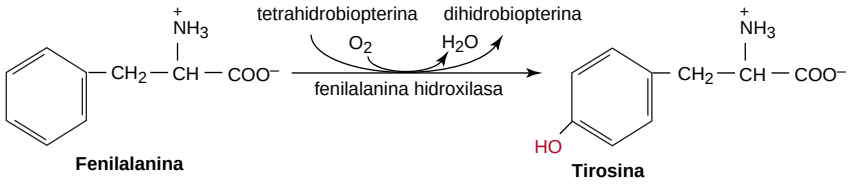
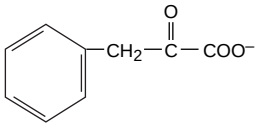
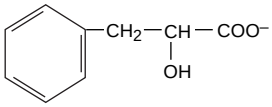


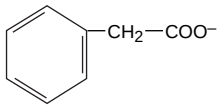
FIGURA 18.46
Fenilanina hidroxilasa.



Fenilpiruvato

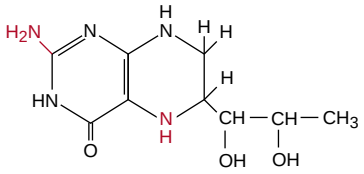


Fenil-lactato

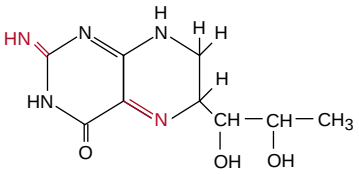


Fenilacetato

FIGURA 18.47
Productos minoritarios del metabolismo de la fenilalanina.



Tetrahidrobiopterina



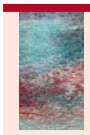
Dihidrobiopterina

FIGURA 18.48
Biopterina.
La forma dihidro- (quinonoide) se produce durante la oxidación de los aminoácidos aromáticos y es reducida entonces a la forma tetrahidro- por una deshidrogenasa que utiliza NADH y H^+.

continuación por un enzima que contiene hierro, la homogentisato oxidasa, para dar maleilacetoacetato. Éste se isomeriza a continuación de la forma cis a la trans produciendo fumarilacetoacetato, en una reacción catalizada por la maleilacetoacetato isomerasa, enzima que parece requerir glutatión para su actividad. El fumarilacetoacetato es escindido a continuación a fumarato y acetoacetato. El fumarato puede utilizarse en el ciclo TCA para producir energía o para la gluconeogénesis. El acetoacetato puede ser utilizado, en forma de acetil CoA, para la síntesis de lípidos o para la producción de energía (véase Apli. Clín. 18.6).

La dopamina, adrenalina y noradrenalina son derivados de la tirosina

La mayor parte de la tirosina no incorporada en las proteínas se metaboliza a acetoacetato y fumarato. Una parte es utilizada como precursor de las **catecolaminas**. El destino metabólico final que seguirán los carbonos de la tirosina viene determinado por el primer paso de cada ruta. La síntesis de catecolaminas (Figura 18.50) se ini-



APLICACIÓN CLÍNICA 18.5
Fenilcetonuria

La fenilcetonuria (PKU) es la enfermedad más corriente provocada por la deficiencia de un enzima del metabolismo de los aminoácidos. Su nombre proviene de la excreción en la orina del ácido fenilpirúvico, una fenilcetona. También son excretados fenil-lactato (Figura 18.47), así como un producto de oxidación del fenilpiruvato, el fenilacetato, que le da a la orina un olor "ligero". Estos tres metabolitos se encuentran sólo a nivel de trazas en la orina de una persona sana. Los síntomas de retraso mental asociados con esta enfermedad pueden ser evitados con una dieta sin fenilalanina. Los gobiernos de muchas partes del mundo obligan a análisis de rutina. La PKU clásica es una deficiencia autosómica recesiva de la fenilalanina hidroxilasa. Se han descrito más de 170 mutaciones en el gen. En algunos casos, se producen síntomas neurológicos graves y valores de CI muy bajos, lo cual se atribuye generalmente a los efectos tóxicos de la fenilalanina, probablemente debido a la reducción del transporte y metabolismo de otros aminoácidos aromáticos en el cerebro, a causa de la competencia por la elevada concentración de fenilalanina. Otra característica es la coloración clara de la piel y ojos, debido a la falta de pigmentación causada por una deficiencia de tirosina. El tratamiento convencional consiste en alimentar a los niños con una dieta sintética baja en fenilalanina, pero que incluya tirosina, durante 4-5 años, y en la restricción de proteínas en la dieta por varios años más, o de por vida.

Alrededor del 3% de los niños con niveles de fenilalanina altos poseen una hidroxilasa normal, pero son defectivos para la síntesis o para la reducción de la biopterina. La deficiencia de biopterina puede tratarse por adición de la misma en la dieta. La deficiencia en dihidrobiopterina reductasa es más grave. Dado que la biopterina es también imprescindible para la síntesis de catecolaminas y serotonina, que actúan de neurotransmisores, las funciones del sistema nervioso central quedan más gravemente afectadas. El tratamiento incluye la administración de precursores de la serotonina y de las catecolaminas.

Brewster, T. G., Moskowitz, M. A. y Kaufman, S. Dihydrobiopterin reductase deficiency associated with severe neurologic disease and mild hyperphenylalanemia. *Pediatrics* 63:94, 1979; Kaufman, S. Regulation of the activity of hepatic phenylalanine hydroxylase. *Adv. Enzyme Regul.* 25:37, 1986; Scriver, C. R. y Clow, L. L. Phenylketonuria: epitome of human biochemical genetics. *N. Engl. J. Med.* 303:1336,1980; y Woo, S. L. C. Molecular basis and population genetics of phenylketonuria. *Biochemistry* 28:1, 1989.

cia con la **tirosina hidroxilasa** que, como la fenilalanina y la triptófano hidroxilasa, es dependiente de tetrahidrobiopterina. Los tres enzimas quedan afectados por la deficiencia de **biopterina** o por un defecto en la **dihidrobiopterina reductasa** (véase Figura 18.48). La tirosina hidroxilasa produce dihidroxifenilalananina, conocida también como DOPA, dioxofenilalanina. La **DOPA descarboxilasa**, con piridoxal fosfato como cofactor, produce **dopamina**, el neurotransmisor activo, a partir de la DOPA. En la *substantia nigra* y otras partes del cerebro éste es el último enzima de esta ruta (véase Apli. Clín. 18.7). La médula suprarrenal convierte la dopamina en **noradrenalina** y **adrenalina** (también llamada **epinefrina**). El grupo metilo de la adrenalina proviene de la *S*-adenosilmetionina (véase p. 803).

La tirosina del plasma cerebral regula la formación de noradrenalina. Los estrógenos disminuyen la concentración de tirosina y aumentan la actividad tirosina aminotransferasa, desviando así la tirosina hacia la ruta catabólica. Además, el sulfato de estrógeno compite por el sitio de unión del piridoxal fosfato en la DOPA descarboxilasa. Estos tres efectos combinados pueden ayudar a explicar algunas de las variaciones de humor durante el ciclo menstrual. La tirosina se utiliza terapéuticamente en algunos casos de depresión y estrés. En pacientes esquizofrénicos, el transporte de tirosina en los fibroblastos de la piel parece estar reducido, lo que indica otros papeles de los derivados de tirosina en trastornos mentales.

Las catecolaminas son metabolizadas por la **monoamino oxidasa** y la **catecolamina *O*-metiltransferasa**. Los principales metabolitos se muestran en la Figura 18.51. La ausencia de estos metabolitos en la orina sirve para diagnosticar una deficiencia en la síntesis de catecolaminas. La ausencia de síntesis de serotonina

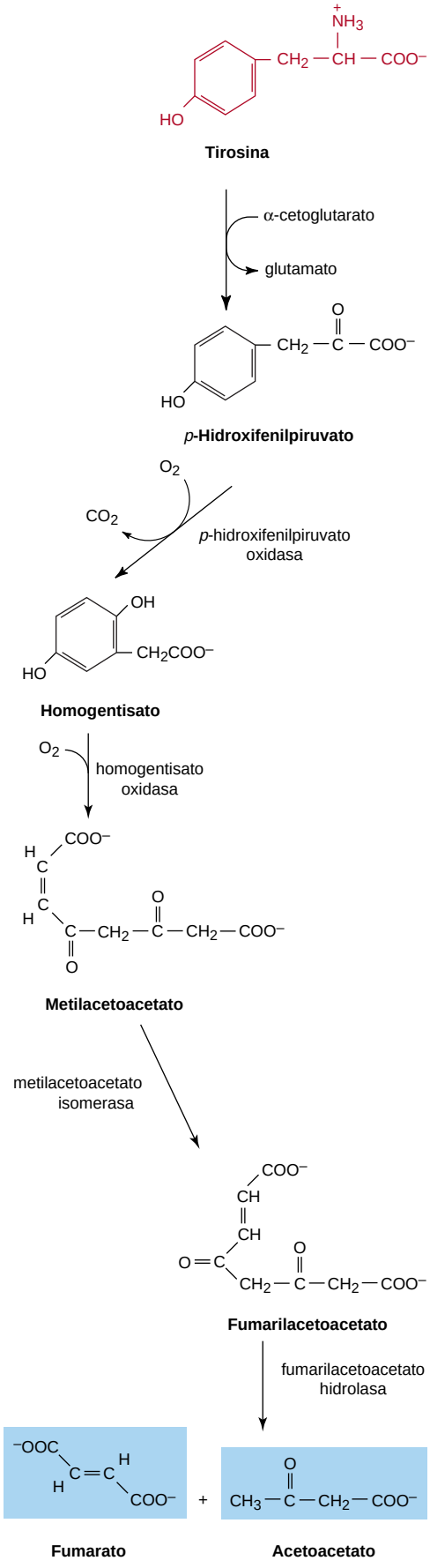


FIGURA 18.49
Degradación de la tirosina.

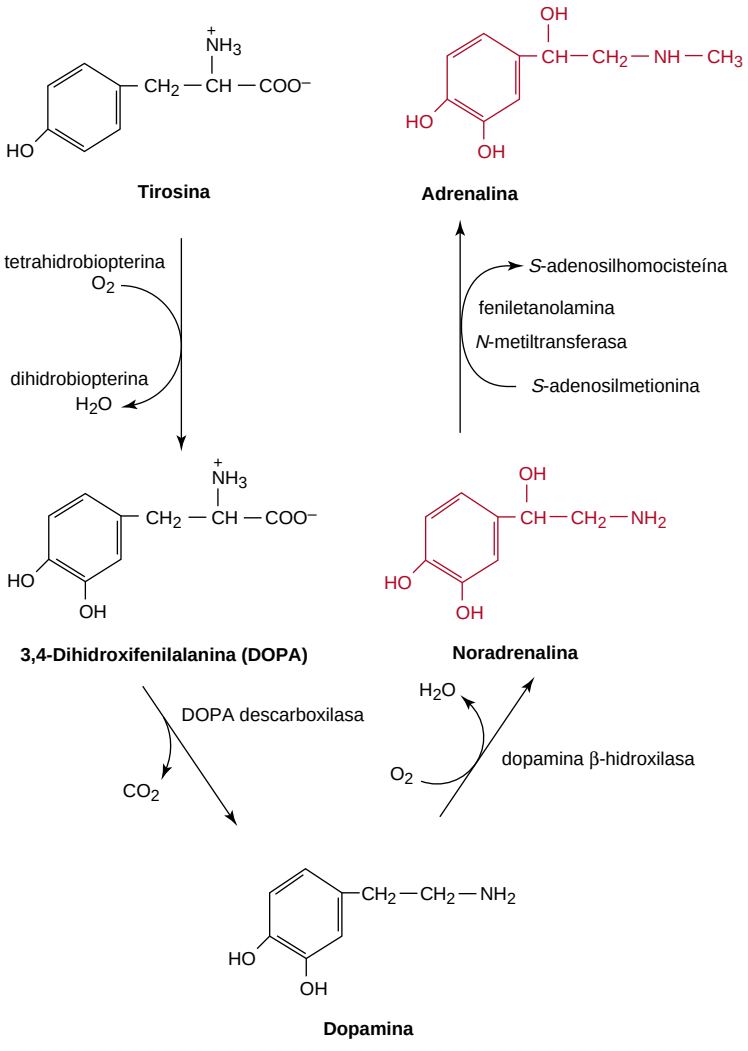
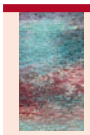


FIGURA 18.50
Síntesis de catecolaminas.



APLICACIÓN CLÍNICA 18.6
Enfermedades del metabolismo de la tirosina

Tirosinemias
La ausencia o deficiencia de tirosina aminotransferasa causa la acumulación y excreción de tirosina y sus metabolitos. La enfermedad se denomina tirosinemia oculocutánea o de tipo II, y produce lesiones en los ojos y la piel y retraso mental. La tirosinemia de tipo I, o hepatorrenal, es más grave e implica lesiones hepáticas, disfunción de los túbulos renales, raquitismo y polineuropatía, provocadas por una deficiencia de fumarilacetoacetato hidrolasa. La acumulación de fumarilacetoacetato y maleilacetato, que son agentes alquilantes, puede conducir a la alquilación del DNA y generación de tumores. Ambas enfermedades son autosómicas recesivas y poco comunes.

Alcaptonuria
La primera enfermedad que se identificó como un "error metabólico congénito" fue la alcaptonuria. Las personas deficientes en homogentisato oxidasa excretan prácticamente toda la tirosina que ingieren en forma de ácido homogentísico, incoloro, en la orina. Este compuesto sufre autooxidación a la correspondiente quinona, que polimeriza y adquiere un intenso color oscuro. En los primeros años de vida, la única consecuencia de esta enfermedad es el color oscuro de la orina. El homogentisato se oxida lentamente a pigmentos que se depositan en los huesos, tejido conjuntivo y otros órganos, condición que se conoce como ocronosis, a causa del color ocre de estos depósitos. Se cree que esta deposición es la responsable de la artritis asociada, especialmente en los varones. El estudio de la alcaptonuria por Archibald Garrod, que fue el primero en señalar su base genética como una condición autosómica recesiva, incluye una descripción histórica inusual de la afección iatrogénica del primer paciente que fue tratado de esta enfermedad, la cual es frecuentemente benigna.

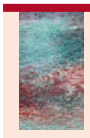
Albinismo
El color de la piel y el cabello están controlados por un número desconocido de loci genéticos; en los ratones se han identificado 147 genes que intervienen en la determinación del color. Se han descrito muchas condiciones en que la piel está poco, o nada, pigmentada. Se desconoce la base química de todas ellas, a excepción del albinismo clásico, que proviene de una falta de tirosinasa. La carencia de pigmento en la piel hace a los albinos sensibles a la luz solar, ocasionando un aumento de carcinomas de piel además de quemaduras; la falta de pigmento en los ojos puede contribuir a la fotofobia.

Fellman, J. H., Vanbellinghan, P. J., Jones, R. T. y Koler, R. D. Soluble and mitochondrial tyrosine aminotransferase. Relationship to human tyrosinemia. *Biochemistry* 8:615, 1969; y Kvittingen, E. A. Hereditary tyrosinemia type I. An overview. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 46:27, 1986.

(véase p. 802) se pone de manifiesto por la falta del ácido 5-hidroxi-indol-3-acético, mostrado en la misma figura.

La tirosina está involucrada en la síntesis de melanina, hormona tiroidea y quinoproteínas

La conversión de la tirosina en melanina requiere **tirosinasa**, una proteína que contiene cobre (Figura 18.52*a*). La reacción, en dos pasos, utiliza DOPA como cofac-



APLICACIÓN CLÍNICA 18.7
Enfermedad de Parkinson

Entre la población mayor de 60 años de edad, aunque algunas veces también en personas más jóvenes, aparecen con frecuencia unos temblores que gradualmente van interfiriendo con la función motora de varios grupos musculares. Este estado se denomina enfermedad de Parkinson, en honor al médico que describió en 1817 esta "parálisis agitante". No se conoce su causa primaria y puede que exista más de un agente etiológico. Este defecto es causado por la degeneración de células de determinados pequeños núcleos del cerebro, denominados substantia nigra, y locus coeruleus. Las células de estos centros producen normalmente dopamina como neurotransmisor, y la cantidad que liberan es proporcional al número de células supervivientes. Una epidemia espectacular de la enfermedad de Parkinson se puso de manifiesto en drogadictos jóvenes que consumían un derivado de la piridina (la metilfeniltetrahidropiridina, MPTP). Parece ser que este compuesto (o un contaminante producido durante su fabricación) es directamente tóxico para las células productoras de dopamina de la sustancia negra. Si se administra DOPA, el precursor de la dopamina, se consigue una mejora, a menudo espectacular, en los síntomas. Cuando se utilizó el DOPA (L-DOPA, levo DOPA) como terapia para el tratamiento del gran número de pacientes que sufrían el mal de Parkinson aparecieron varios problemas clínicos. Entre los problemas secundarios se contaron náuseas, vómitos, hipotensión, arritmias cardíacas y diversos síntomas en el sistema nervioso central, los cuales se explican como efectos de la dopamina producida fuera del sistema nervioso central. Cuando se administran análogos del DOPA que inhiben la DOPA descarboxilasa y que son incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica, se produce tanto una disminución de efectos secundarios, como un aumento en la efectividad del DOPA. Las interacciones entre los diversos neurotransmisores son muy complejas; después de este tratamiento la degeneración celular continúa, y la elucidación del principal problema bioquímico no ha conducido a un control completo de la enfermedad de Parkinson. Se han llevado a cabo recientemente intentos de tratar la enfermedad de Parkinson mediante el trasplante de tejido de médula adrenal fetal al cerebro. Dicho tejido sintetiza dopamina y mejora el desorden de los movimientos.

Calne, D. B. y Langston, J. W. Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* 2:1457, 1983; y Cell and tissue transplantation into the adult brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 495, 1987.

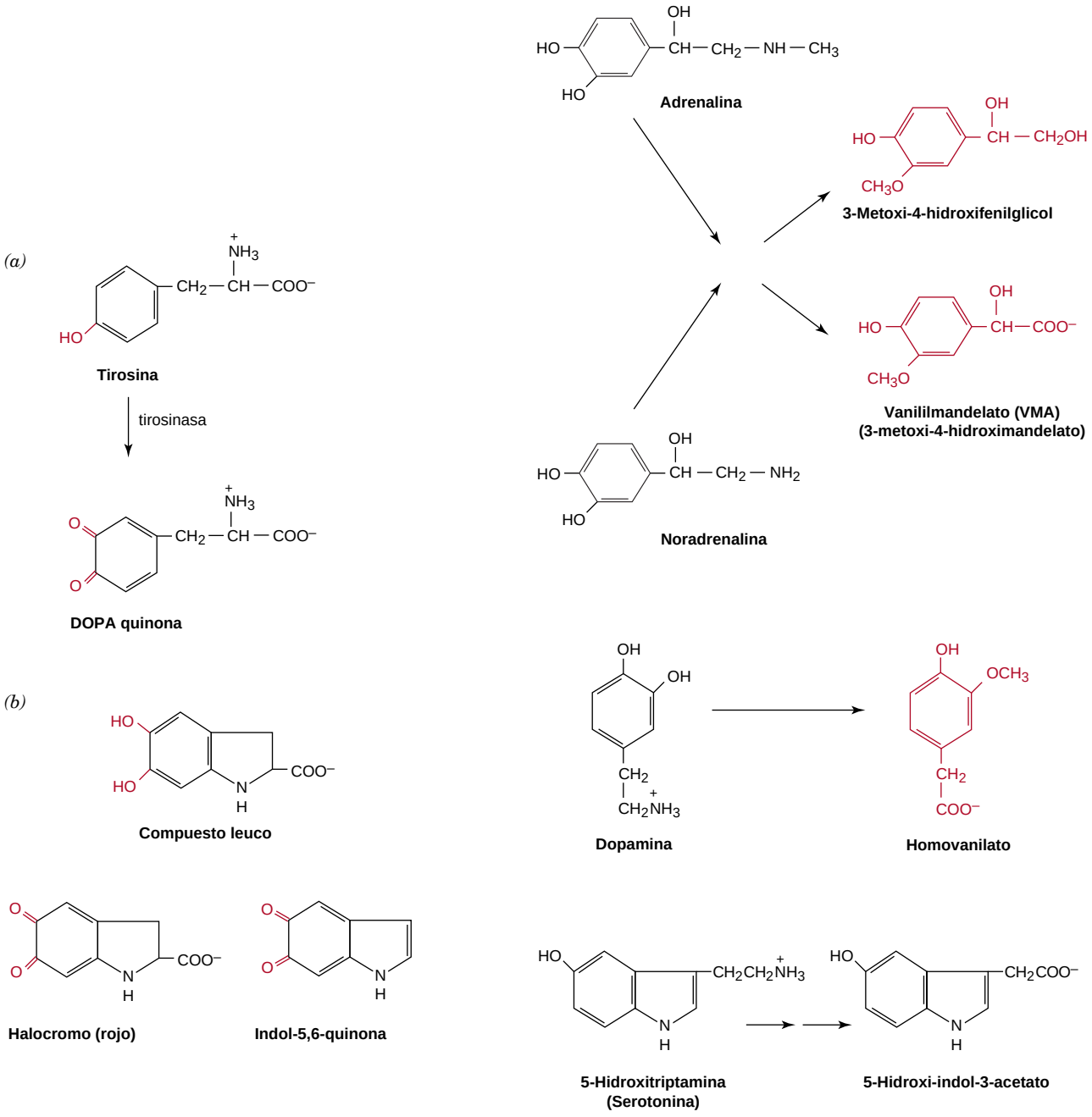
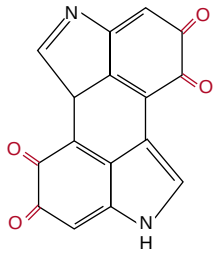


FIGURA 18.51
Principales productos de excreción urinaria de la dopamina, adrenalina, noradrenalina y serotonina.



Estructura de una eumelanina

FIGURA 18.52
(*a*) La tirosinasa utiliza DOPA como cofactor/intermediario; (*b*) algunos intermediarios en la síntesis de melanina y un ejemplo de la familia de las eumelaninas negras.

tor interno de la reacción y produce **dopaquinona**. Durante la melanogénesis, después de la exposición a la luz ultravioleta, se inducen la tirosinasa y una proteína denominada proteína relacionada con la tirosinasa, que pueden intervenir en la modificación post-traducción de la tirosinasa. Una falta de actividad tirosinasa produce el **albinismo**. Existen varios tipos de **melanina** (Figura 18.52*b*). Todas son quinonas aromáticas y el sistema de enlaces conjugados da lugar al color. El pigmento oscuro que está normalmente asociado con la melanina es la eumelanina, del griego "melanina buena". Otras melaninas son amarillas o incoloras. El papel de los residuos de tirosina de la tiroglobulina en la síntesis de la hormona tiroidea se presenta en el capítulo donde se tratan las hormonas (véase p. 919).

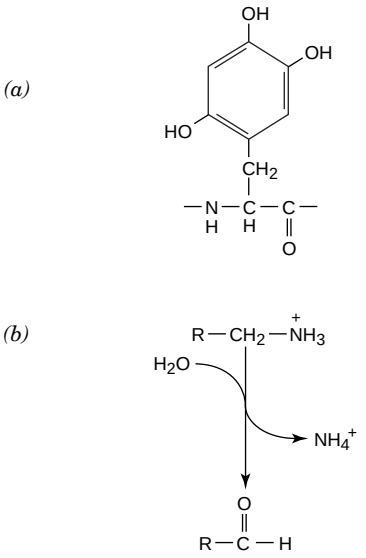


FIGURA 18.53
(*a*) Topaquinona y (*b*) reacción de la amino oxidasa.

Algunas proteínas utilizan un residuo de tirosina modificado como grupo prostético en reacciones de oxidación–reducción. El único ejemplo descrito en el ser humano es la **topaquinona** (trihidroxifenilalanilquinona), que se halla en algunas amino oxidasas plasmáticas (Figura 18.53).

Metionina y cisteína

La síntesis *de novo* de la **metionina** no se da en el organismo humano, por lo que la metionina es esencial. La **cisteína**, sin embargo, se sintetiza por transferencia del átomo de azufre de la metionina al grupo hidroxilo de la serina. Mientras exista un aporte de metionina adecuado, la cisteína no es esencial. La utilización de los átomos individuales de la metionina y cisteína es un ejemplo excelente de cómo las células regulan las rutas metabólicas para satisfacer sus necesidades inmediatas de energía u otros propósitos. Destacaremos las condiciones en que se da preferencia a cada una de las diferentes rutas.

La metionina reacciona primero con la adenosina trifosfato

Cuando hay un exceso de metionina sus carbonos pueden utilizarse para la producción de energía o para la gluconeogénesis, y el azufre es retenido como grupo sulfhidrilo de la cisteína. La Figura 18.54 muestra el primer paso, catalizado por la **metionina adenosiltransferasa**. En la reacción se pierden todos los fosfatos del ATP, y el producto es la ***S*-adenosilmetionina** (abreviadamente **AdoMet**, o **SAM**, en referencias más antiguas). El ion sulfonio es altamente reactivo, y el metilo es un buen grupo saliente. El papel de la AdoMet como dador de grupos metilo se tratará más adelante. Después de que una metiltransferasa elimine el grupo metilo, la ***S*-adenosilhomocisteína** resultante es escindida por la **adenosilhomocisteinasa** (Figura 18.55). Obsérvese que la homocisteína tiene un carbono más que la cisteína. Aunque los carbonos están destinados al metabolismo intermediario, el azufre, un átomo más especializado, será conservado a través de su transferencia a la serina para formar cisteína. Esta conversión requiere la **cistationina sintasa**, dependiente de piridoxal fosfato, y la **cistationasa** (Figura 18.55; véase Apli. Clín. 18.8). Puesto que el enlace que forma la cistationina se establece en un lado del azufre y la rotura posterior tiene lugar en el otro lado, el resultado es una **transulfuración** (véase Apli. Clín. 18.9). La homocisteína produce α-cetobutirato y amoníaco. El α-cetobutirato es descarboxilado por un complejo multienzimático parecido a la pi-

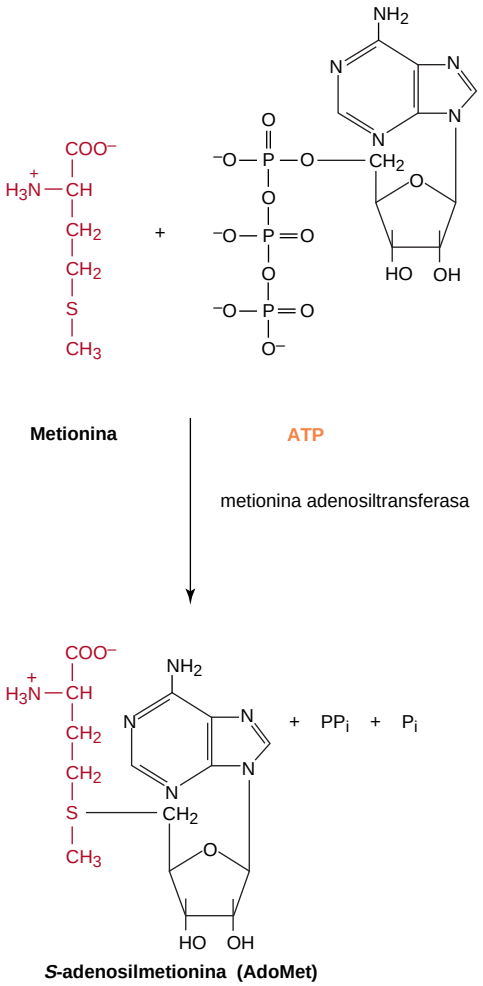


FIGURA 18.54
Síntesis de la *S*-adenosilmetionina.

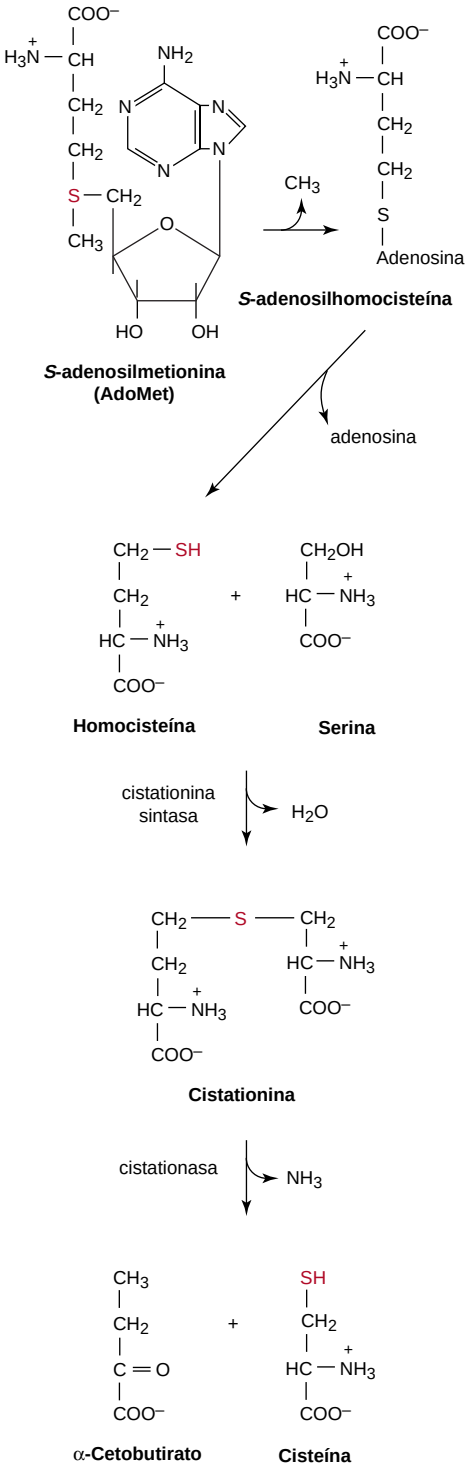
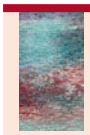


FIGURA 18.55
Síntesis de la cisteína a partir de la *S*-adenosilmetionina.

ruvato deshidrogenasa y produce propionil CoA, que es convertido a continuación en succinil CoA en la forma descrita en la p. 814.

Cuando hay necesidad de energía, y no de cisteína, la homocisteína producida en la ruta anterior es metabolizada por la **homocisteína desulfhidrasa** a α-cetobutirato, NH_3 y H_2S (Figura 18.56).



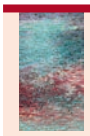
APLICACIÓN CLÍNICA 18.8
Hiperhomocisteinemia y aterogénesis

La deficiencia de cistationina sintasa provoca la acumulación de homocisteína, y la remetilación de ésta conduce a niveles elevados de metionina. Se forman y excretan muchos productos minoritarios de estos aminoácidos. No se ha establecido ningún mecanismo que explique por qué la acumulación de homocisteína conduce a algunos de los cambios patológicos. La homocisteína podría reaccionar con los grupos aldehído de las lisinas del colágeno, bloqueándolos. El cristalino del ojo sufre dislocación algo después de los 3 años de edad, y a menudo tienen lugar otras anomalías. Durante la infancia se desarrolla osteoporosis, y la primera indicación de la enfermedad es a menudo el retraso mental. Los intentos de tratamiento incluyen la restricción de la ingestión de metionina y el suministro de betaína (o de su precursor, la colina). En algunos casos se ha conseguido una notable mejoría mediante el suministro de piridoxina (vitamina B_6), lo que indicaría que la deficiencia puede ser causada por más de un tipo de mutación genética; un tipo podría afectar a la K_m hacia el piridoxal fosfato y otros podrían alterar la K_m hacia otros sustratos, V_{max}, o la cantidad de enzima. Se ha propuesto una teoría que relaciona la hiperhomocisteinemia con la aterogénesis. La homocisteína en exceso puede formar homocisteína tiolactona, un intermediario altamente reactivo, que forma tiolatos con los grupos amino libres de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y provoca su agregación y endocitosis por los macrófagos. Los depósitos lipídicos forman ateromas. La homocisteína puede tener otros efectos, entre ellos la oxidación de lípidos y la agregación plaquetaria, que a su vez conducen a fibrosis y calcificación de las placas ateroscleróticas. Se ha encontrado una deficiencia de actividad cistationina sintasa en alrededor de la cuarta parte de los pacientes con aterosclerosis que no tienen ninguno de los otros factores de riesgo (como por ejemplo fumar o la terapia anticonceptiva oral).

Kaiser-Kupfer, M. I., Fujikawa, L., Kuwabara, T., et al. Removal of corneal crystals by topical cysteamine in nephrotic cystinosis. *N. Engl. J. Med.* 316:775, 1987; y McCully, K. S. Chemical pathology of homocysteine I. Atherogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 23:477, 1993.

La S-adenosilmetionina es un dador de grupos metilo

El papel del tetrahidrofolato como dador de unidades monocarbonadas ha sido descrito anteriormente (véase p. 794). Aunque este cofactor podría servir teóricamente como fuente de grupos metilo, la inmensa mayoría de las reacciones de metiltransferasas utilizan ***S*-adenosilmetionina**. La transferencia de un grupo metilo desde la AdoMet a un aceptor de metilo es irreversible. En la Figura 18.57 se muestra un ejemplo. La *S*-adenosilhomocisteína que queda después de la transferencia del grupo metilo puede ser metabolizada a cisteína, α-cetobutirato y amoníaco. Cuando las células necesitan volver a sintetizar metionina, es necesario otro enzima, puesto que la reacción de transferencia de metilo es irreversible (Figura 18.58). La **homocisteína metiltransferasa** es uno de los dos enzimas que se conocen que precisa vitamina B_{12} como cofactor (el otro se describe en la p. 814). El grupo metilo proviene del N^5-metiltetrahidrofolato. Esta es la única reacción conocida que utiliza esta forma del



APLICACIÓN CLÍNICA 18.9
Otras enfermedades de los aminoácidos sulfurados

La deficiencia congénita de cualquiera de los enzimas involucrados en la transulfuración provoca la acumulación de aminoácidos sulfurados. La hipermetioninemia ha sido atribuida a una deficiencia en la metionina adenosiltransferasa, causada probablemente por un mutante de K_m que requiere concentraciones de metionina mayores de la normal para su saturación, pero que funciona normalmente en reacciones de metilación. La carencia de cistationasa no parece ocasionar anomalías clínicas salvo la cistationinuria. El primer caso descrito de esta deficiencia fue el de un paciente con retraso mental, y el retraso se atribuyó a esta deficiencia. Parece ser que el retraso mental era una coincidencia, y la condición es benigna. La cantidad de cisteína sintetizada en estas deficiencias es desconocida, pero no es necesario el tratamiento con una dieta baja en metionina para la hipermetioninemia.

Enfermedades que implican a la cistina

La cistinuria es un defecto del transporte de membrana de la cistina y los aminoácidos básicos (lisina, arginina y ornitina) que provoca un incremento en su excreción renal. Los compuestos sulfhidrílicos extracelulares son rápidamente oxidados a disulfuros. La baja solubilidad de la cistina conduce a su cristalización y la formación de cálculos, una grave característica de esta enfermedad. El tratamiento se limita a la extracción de las piedras, la prevención de la precipitación a base de beber grandes cantidades de agua o alcalinizar la orina para solubilizar la cistina, o formar derivados solubles por conjugación con fármacos. Mucho más grave es la cistinosis en la que la cistina se acumula en los lisosomas. La cistina almacenada forma cristales en muchas células, con grave pérdida de la función renal, que causa a menudo insuficiencia renal en menos de diez años. Se cree que el defecto está en el transportador de cistina de las membranas lisosómicas.

Seashore, M. R., Durant, J. L. y Rosenberg, L. E. Studies on the mechanisms of pyridoxine responsive homocystinuria. *Pediatr. Res.* 6:187, 1972; Mudd, S. H. The natural history of homocystinuria due to cystathione β-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 37:1, 1985; y Frimpter, G. W. Cystathionuria: nature of the defect. *Science* 149:1095, 1965.

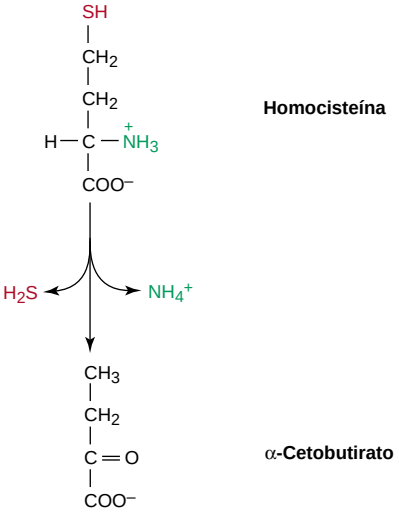


FIGURA 18.56
Homocisteína desulfhidrasa.

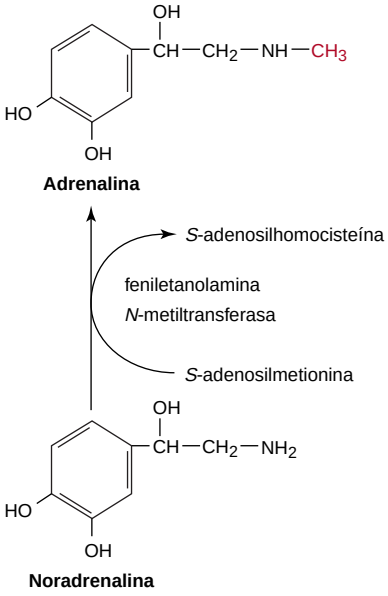


FIGURA 18.57
Reacción de la *S*-adenosilmetiltransferasa.

tetrahidrofolato como dador de metilo. El resultado neto de las reacciones de las Figuras 18.57 y 18.58 es la donación de un grupo metilo y la regeneración de la metionina en condiciones de escasez de metionina. Una ruta de reciclaje menor utiliza un grupo metilo de la **betaína** en lugar del N^5-metiltetrahidrofolato.

La S-adenosilmetionina es el precursor de la espermidina y la espermina

La **propilamina** que se adiciona a la **putrescina** (véase p. 793) para formar **espermidina** y **espermina** proviene también de la AdoMet, dejando metiltioadenosina. La putrescina se forma por descarboxilación de la ornitina (véase p. 793) y, junto con la propilamina, forma la espermidina. La adición de otra molécula de propilamina proporciona la espermina (Figura 18.59). La metiltioadenosina resultante puede ser utilizada para sintetizar de nuevo metionina. Una gran parte de la poliamina necesaria para el organismo es suministrada por la microflora en el intestino o por la dieta y es transportada por la circulación enterohepática. La carne tiene un alto contenido de putrescina, pero otros alimentos contienen más espermidina y espermina.

El grupo butilamino de la espermidina es utilizado para la modificación postraducción de un residuo de lisina específico en el eIF-4D, un factor de iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotas. El grupo es hidroxilado a continuación y el residuo modificado resultante recibe el nombre de **hipusina** (Figura 18.60).

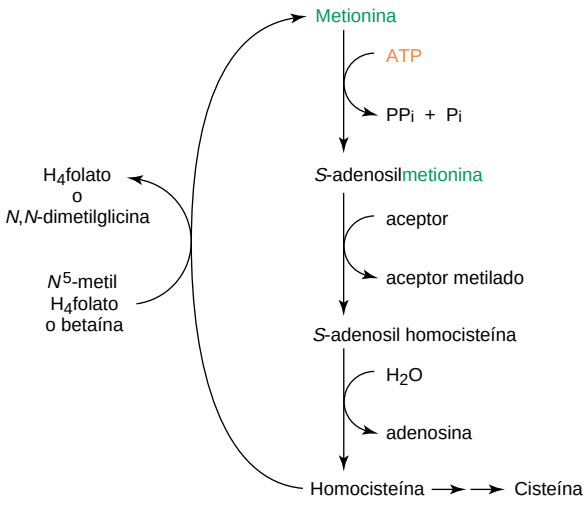


FIGURA 18.58
Resíntesis de la metionina, una reacción dependiente de metilcobalamina.

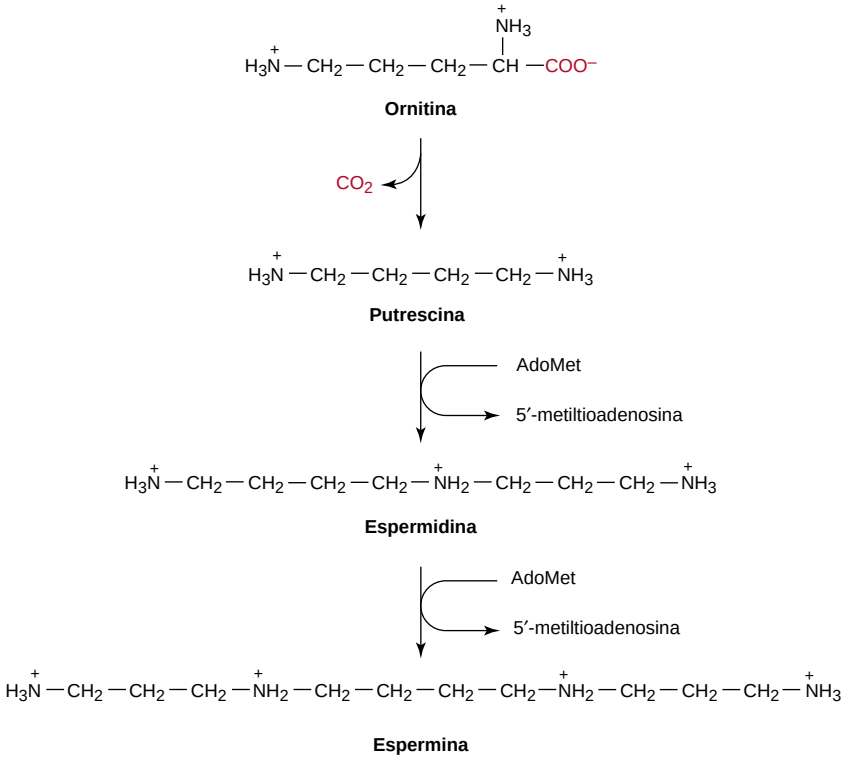


FIGURA 18.59
Síntesis de poliaminas.

El metabolismo de la cisteína produce compuestos que contienen azufre

La cisteína, que proviene del azufre de la homocisteína y de una molécula de serina, se metaboliza de diferentes maneras. La ruta escogida viene determinada por las necesidades de la célula. El metabolito principal es el **cisteína sulfinato** (Figura 18.61). Éste es metabolizado seguidamente a sulfito y piruvato, o a hipotaurina y taurina. La taurina es un aminoácido libre intracelular abundante, cuyo papel preciso es desconocido, aunque parece que es necesaria en el desarrollo del cerebro. La taurina forma conjugados con ácidos biliares (véase p. 1107) y puede facilitar el flujo de la bilis e incrementar la eliminación de colesterol del hígado. La taurina podría también de-

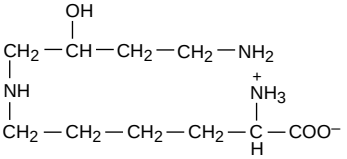


FIGURA 18.60
Hipusina.

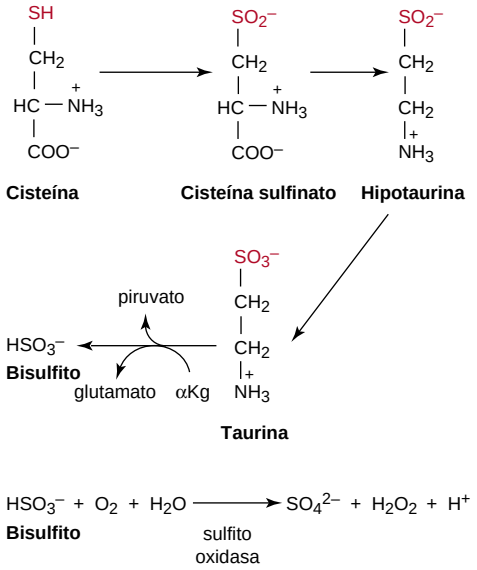
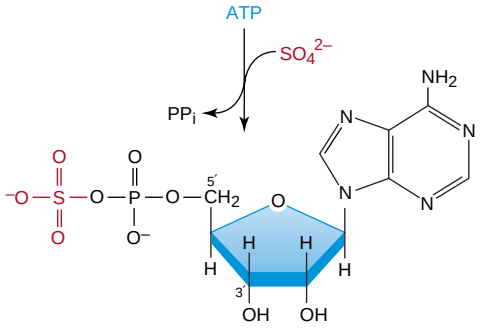


FIGURA 18.61
Formación de taurina y sulfato a partir de la cisteína.



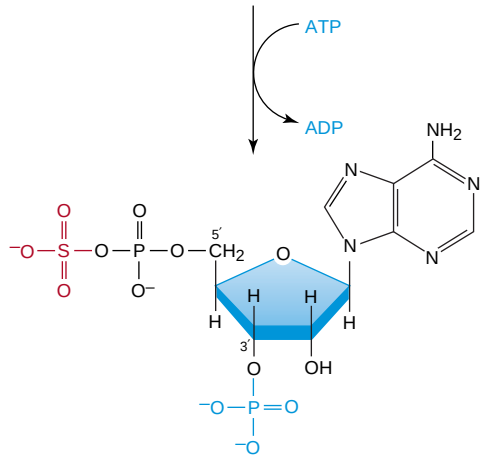


FIGURA 18.62
Síntesis del PAPS.

sempeñar un papel en el reciclaje de intermediarios tóxicos, en la regulación del calcio intracelular y, dada su abundancia, en la regulación osmótica.

El **sulfito** producido por el metabolismo de la cisteína puede ser oxidado a **sulfato** (Figura 18.61), y éste puede ser utilizado en la formación del **3′-fosfoadenosina-5′-fosfosulfato (PAPS)**, que es la fuente para la adición de grupos sulfato a moléculas biológicas (Figura 18.62).

Otra reacción del metabolismo de la cisteína catalizada por la cistationasa, transfiere el azufre de una cisteína a otra cisteína (Figura 18.63), dando la **tiocisteína**. El tiosulfato se forma a partir de la cisteína en la forma mostrada en la Figura 18.64. Un enzima denominado **rodanasa** puede incorporar un azufre del tiosulfato o de la tiocisteína en otras moléculas, como por ejemplo el ion cianuro (Figura 18.65).

Triptófano

El metabolismo del **triptófano** tiene muchos puntos de ramificación. La ruta dominante, o ruta oxidativa del triptófano, se inicia en el ser humano (Figura 18.66, en color) con la oxidación del triptófano a *N*-formilquinurenina, por un enzima que contiene un grupo hemo, la **triptófano dioxigenasa**, llamada también **triptófano pirrolasa** o **triptófano oxigenasa**, por ocasionar la rotura del anillo pirrólico durante la reacción. La triptófano dioxigenasa es inducida por los glucocorticoides y por el glucagón. Se encuentra en el hígado; otros tejidos contienen un enzima similar llamado indolamina dioxigenasa, que tiene menor especificidad de sustrato. La formamidasa hidroliza a continuación la formilquinurenina a formiato y quinurenina. En este punto la ruta empieza a ramificarse. En la vía dominante, las reacciones conducen a la 3-hidroxiquinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico y alanina, semialdehído amino-carboximucónico y, por descarboxilación, al semialdehído aminomucónico. Éste puede ser metabolizado a glutarato, en varios pasos, y finalmente a acetoacetil CoA, o reciclado de forma no enzimática a **ácido picolínico**, el cual es excretado en la orina.

El triptófano es un precursor del NAD

El **triptófano** es el precursor de aproximadamente el 50% de los nucleótidos piridínicos del organismo. El resto se obtiene de la dieta. El punto de ramificación que conduce al mononucleótido de nicotinato puede verse en la Figura 18.66, en la etapa del semialdehído aminocarboximucónico. El enzima que forma el semialdehído 2-ami-

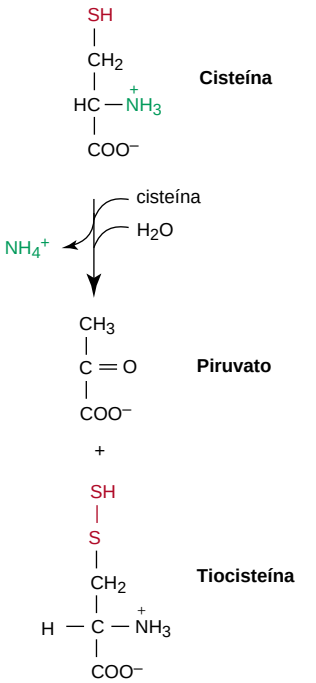


FIGURA 18.63
Síntesis de la tiocisteína.

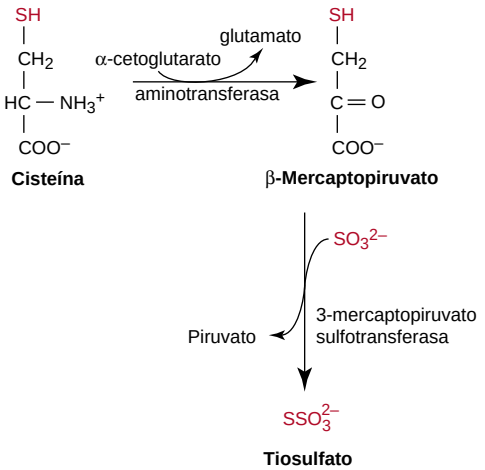


FIGURA 18.64
Formación del tiosulfato.

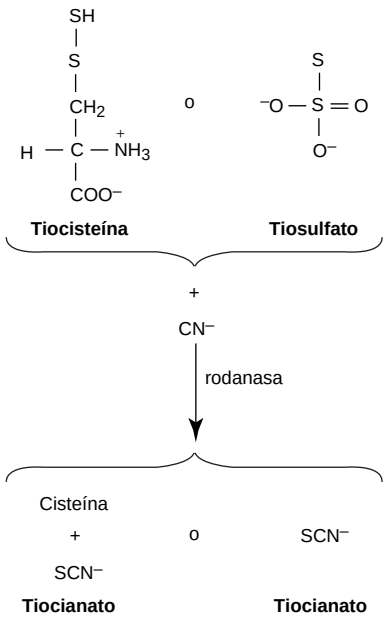


FIGURA 18.65
Destoxificación de cianuro por productos del metabolismo de la cisteína.

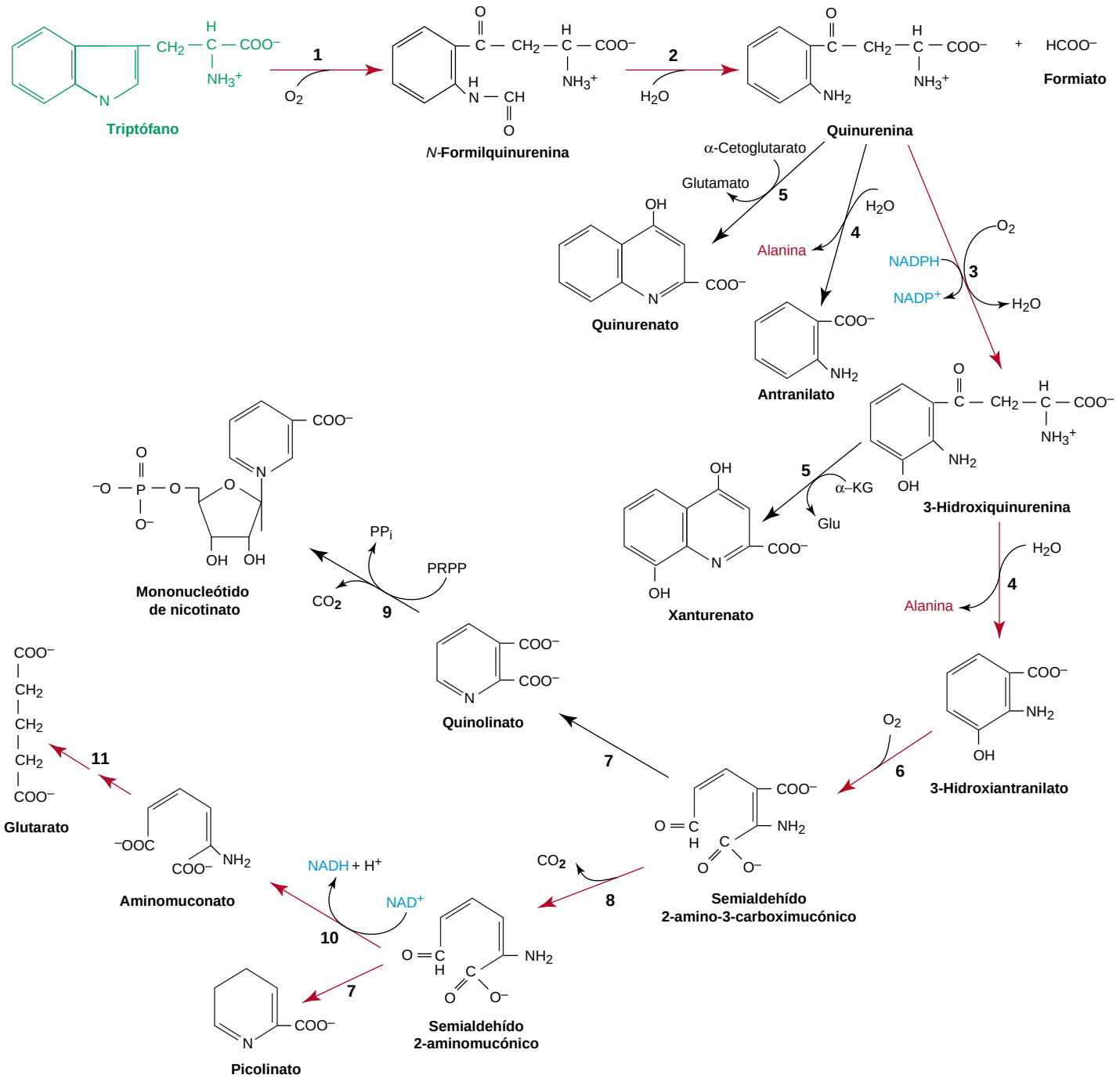


FIGURA 18.66
Metabolismo del triptófano.
La ruta principal está indicada en rojo. Los enzimas indicados por los números son: (1) triptófano oxigenasa, (2) quinurenina formamidasa, (3) quinurenina hidroxilasa, (4) quinureninasa, (5) aminotransferasa, (6) 3-hidroxiantranilato oxidasa, (7) reacción espontánea no enzimática, (8) picolinato carboxilasa, (9) quinolinato fosforribosiltransferasa, (10) aldehído deshidrogenasa y (11) serie compleja de reacciones.

nomucónico a partir de este compuesto, la picolinato carboxilasa, tiene una K_m baja y es fácilmente saturada por el sustrato. Como la **picolinato carboxilasa** tiene una actividad baja en el hígado, algo del semialdehído aminocarboximucónico cicla a ácido quinolínico en una reacción no enzimática. La porción ribonucleotídica es suministrada por el fosforribosilpirofosfato, y el último paso es una descarboxilación que conduce al mononucleótido de nicotinato. Obsérvese que el anillo de ácido nicotínico se sintetiza como parte del nucleótido. Como la **quinurenina hidroxilasa** es inhibida por estrógenos, las mujeres son más susceptibles a la **pelagra**, la enfermedad producida por la deficiencia de niacina (del italiano *pelle*, piel, y *agra*, rugosa).

El piridoxal fosfato tiene un papel fundamental en el metabolismo del triptófano
Muchos enzimas de esta larga ruta son dependientes de piridoxal fosfato. La **quinureninasa** es uno de ellos, y se ve afectado por una deficiencia de vitamina B_6 (Figura 18.66), que ocasiona una excreción en exceso de quinurenina y xanturenato que da a la orina una coloración amarillo-verdosa. Este es un síntoma para el diagnóstico de una deficiencia de vitamina B_6.

La quinurenina da lugar a neurotransmisores
La quinurenina puede transaminarse con condensación de la cadena lateral formando un compuesto bicíclico, el **ácido quinurénico**. Esta reacción se muestra también en la Figura 18.66. El ácido quinurénico, su metabolito descarboxilado **quinuramina** y el **quinolinato** actúan todos como neurotransmisores derivados del triptófano, posiblemente como antiexcitotóxicos y anticonvulsivos.

La serotonina y la melatonina son derivados del triptófano
La serotonina (5-hidroxitriptamina) proviene de la hidroxilación del triptófano por un enzima dependiente de tetrahidrobiopterina y de su descarboxilación por un enzima que contiene piridoxal fosfato (Figura 18.67*a*). Es un neurotransmisor en el cerebro y produce la contracción de los músculos lisos de arteriolas y bronquiolos. Está ampliamente distribuida en el organismo y puede que desempeñe otros papeles fisiológicos. La **melatonina**, una molécula que induce el sueño, es la

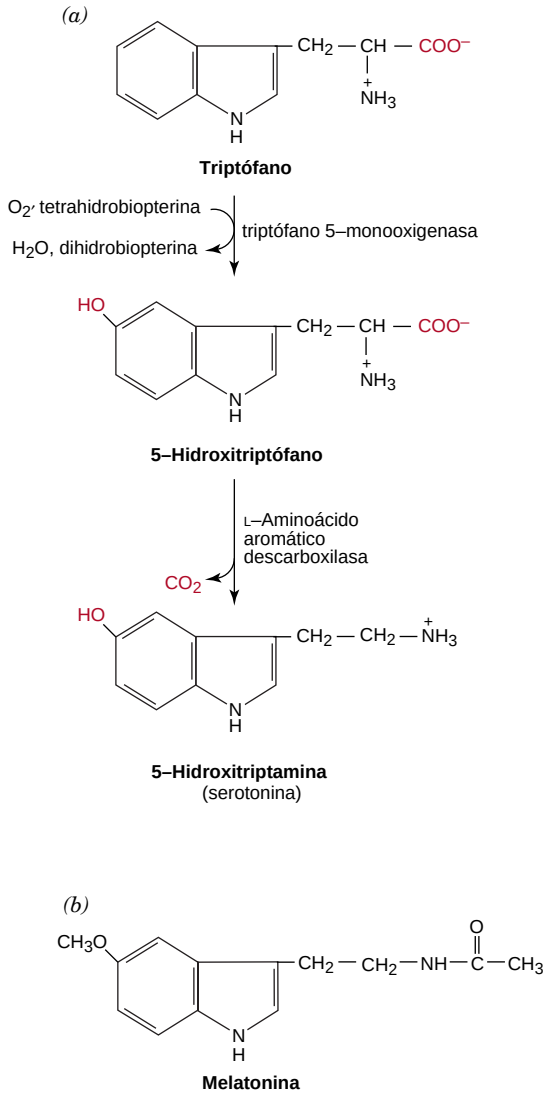


FIGURA 18.67
(*a*) Síntesis de la serotonina (5-hidroxitriptamina) y (*b*) estructura de la melatonina.

N-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 18.67*b*). La acetiltransferasa necesaria para su síntesis se encuentra en la hipófisis y en la retina. La melatonina está implicada en la regulación del ritmo circadiano, siendo sintetizada en su mayor parte por la noche. Parece que funciona inhibiendo la síntesis y secreción de otros neurotransmisores tales como la dopamina y el GABA (véase p. 1000).

El triptófano induce el sueño

La ingestión de alimentos ricos en triptófano ocasiona somnolencia debido a que la serotonina resultante es también inductora del sueño. La reducción de la disponibilidad de triptófano por el cerebro puede interferir con el sueño. La disponibilidad de triptófano disminuye cuando otros aminoácidos compiten con éste por el transporte a través de la barrera hematoencefálica. Una concentración elevada de otros aminoácidos en plasma, después de una comida rica en proteína, disminuye el transporte de triptófano e induce insomnio. El efecto inductor del sueño de los glúcidos se debe a la disminución de los niveles de aminoácidos en plasma, ya que los glúcidos estimulan la liberación de insulina, y ésta causa la eliminación de los aminoácidos del plasma y su incorporación al músculo. Esto disminuye la competencia y ocasiona un aumento de la cantidad de triptófano que puede entrar en el cerebro. Curiosamente, una cantidad extra de serotonina parece causar somnolencia a las mujeres, pero solamente sedación a los hombres.

Aminoácidos de cadena ramificada

El metabolismo de los **aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, branched chain amino acids) —valina**, **isoleucina** y **leucina—** es especial, y se inicia en el músculo. Durante su metabolismo se forma NADH, por lo que constituyen una excelente fuente de energía. La BCAA aminotransferasa está presente en el músculo a una concentración mucho mayor que en el hígado. Aunque los tres aminoácidos conducen a productos diferentes, los pasos iniciales de su metabolismo son similares.

Las reacciones iniciales del metabolismo de los BCAA son comunes

Existen tres isozimas de la **BCAA aminotransferasa**, que están distribuidos de diferente forma entre diferentes tejidos; algunas veces se hallan en el citosol y otras en las mitocondrias (Figura 18.68). Dos de ellos son capaces de utilizar los tres BCAA, mientras que el tercero es específico para la leucina. La inanición induce las aminotransferasas del músculo, pero no afecta a estos enzimas en el hígado. Los α-cetoácidos de cadena ramificada resultantes sufren una descarboxilación oxidativa por un complejo enzimático situado en la membrana interna de la mitocondria, similar al complejo de la piruvato deshidrogenasa, que produce NADH y CO_2. El componente deshidrogenasa del complejo tiene algo de actividad cuando está fosforilado, pero su actividad se incrementa enormemente por desfosforilación. Parece ser que un mismo enzima metaboliza los tres α-cetoácidos de cadena ramificada. Su forma más activa se halla en el hígado en estado de alimentación, y en el músculo durante la inanición, reflejando el metabolismo de los BCAA de la dieta en el hígado, y de los BCAA del músculo para suministrar energía durante el ayuno. Los compuestos derivados de CoA resultantes poseen un carbono menos que el aminoácido original en su cadena, y son metabolizados a continuación por un enzima parecido a la primera deshidrogenasa en la ruta de la β-oxidación de los ácidos grasos.

Las rutas del metabolismo de valina e isoleucina son similares

La valina y la isoleucina continúan por una ruta común, que consiste en una adición de agua al doble enlace formando un intermediario hidroxilado (Figura 18.69). El grupo hidroxilo del derivado de la isoleucina es oxidado por el NAD^+, seguido de una tiólisis, lo que conduce a acetil CoA y propionil CoA. El derivado de valina pierde CoA y es oxidado por el NAD^+ a semialdehído metilmalónico, que se convierte a continuación en propionil CoA.

La ruta de la leucina difiere de las de los otros dos aminoácidos de cadena ramificada

La posición del grupo metilo de la cadena lateral de la leucina impide el paso de oxidación que se da en el metabolismo de los otros BCAA (Figura 18.70). El derivado con un doble enlace es carboxilado, hidroxilado y escindido a acetoacetato y

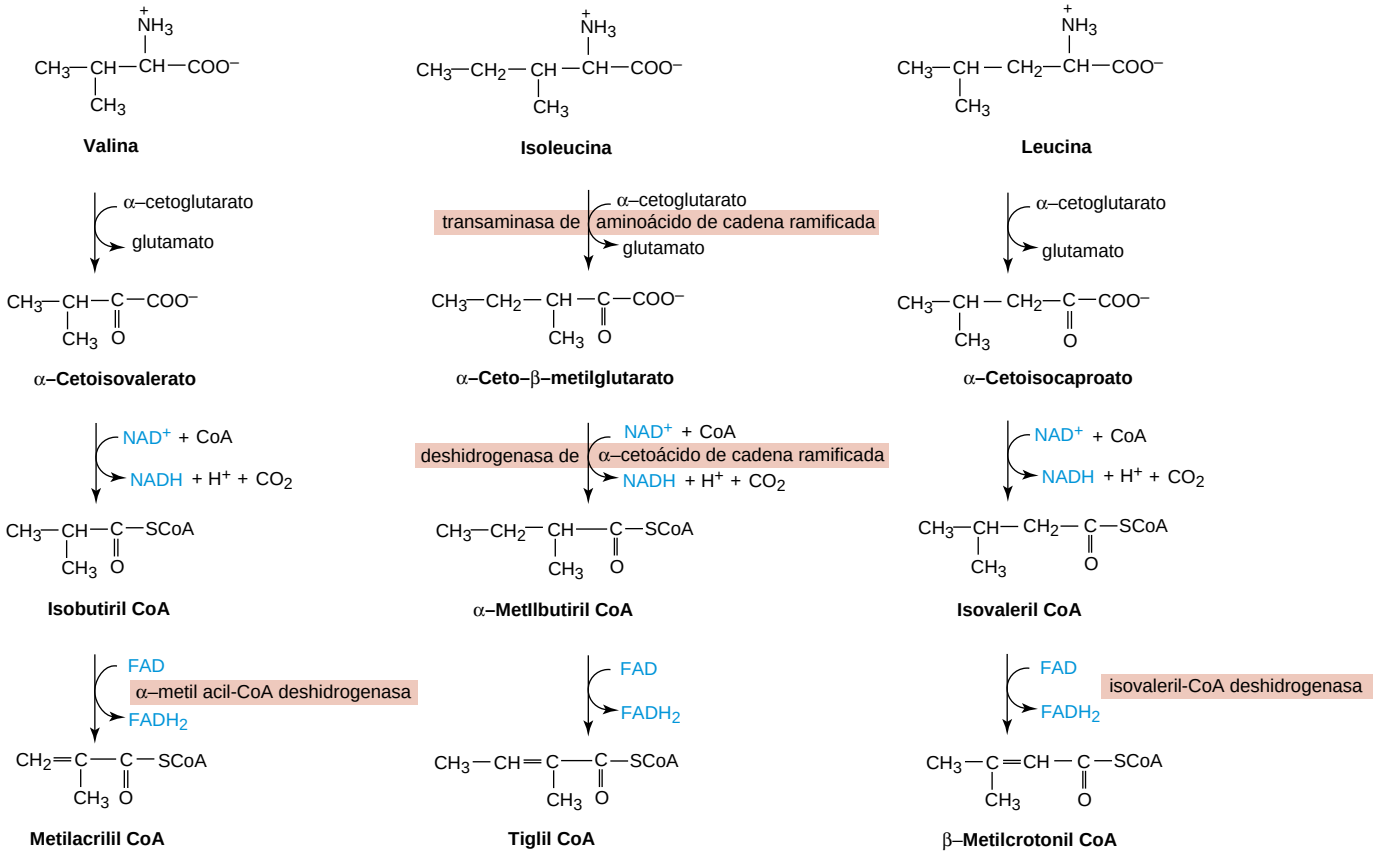


FIGURA 18.68
Reacciones comunes en la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada.

acetil CoA. Uno de los intermediarios es el ***β*-hidroxi-*β*-metilglutaril CoA**, un intermediario de la síntesis citosólica de esteroides (véase p. 743). Como la degradación de los BCAA tiene lugar en las mitocondrias, las dos reservas no se mezclan. La leucina tiene también una ruta minoritaria alternativa (no mostrada), que conduce a la excreción de ácido 3-hidroxivalérico, y que puede ser utilizada en caso de bloqueo de la ruta de degradación de la leucina (Apli. Clín. 18.10).

El propionil CoA se metaboliza a succinil CoA

El **propionil CoA** es un producto final del metabolismo de la isoleucina, valina y metionina, de la oxidación de los ácidos grasos de cadena impar y de la degradación de la cadena lateral del colesterol. El primer paso en la conversión del propionil CoA, de tres carbonos, en succinil CoA, de cuatro carbonos, es iniciado por la **propionil-CoA carboxilasa**, que es dependiente de biotina (Figura 18.71; véase Apli. Clín. 18.11). Esto conduce a D-metilmalonil CoA, que es convertido por una racemasa en una mezcla de D- y L-metilmalonil CoA. La **metilmalonil-CoA mutasa**, que requiere 5'-desoxiadenosilcobalamina (un derivado de la vitamina B_{12}), convierte el isómero L en succinil CoA. Este es el segundo enzima del que se sabe que es dependiente de vitamina B_{12} (véase p. 805). La reacción es muy inusual; quita un metilo de la cadena lateral y lo inserta como un grupo metileno en el esqueleto de compuesto.

Lisina

La **lisina**, al igual que la leucina, es totalmente cetogénico. Los carbonos entran en el metabolismo intermediario en forma de acetoacetil CoA. La lisina posee un grupo amino ***ε*** y uno ***α***. La transaminación inicial del grupo ***ε***-amino requiere ***α***-cetoglu-

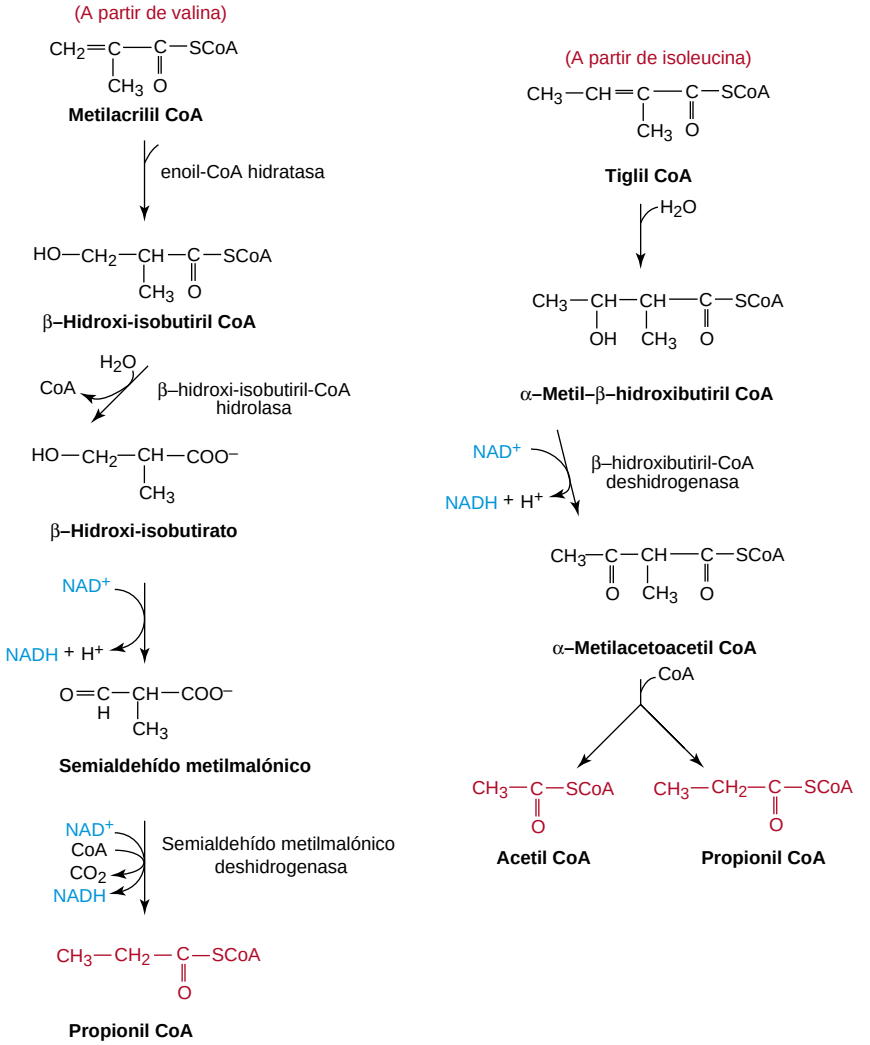


FIGURA 18.69
Reacciones terminales de degradación de la valina e isoleucina.

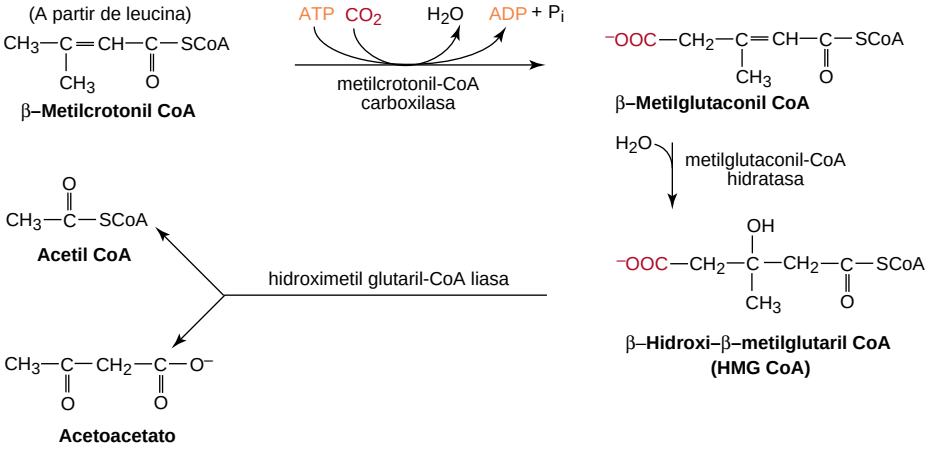
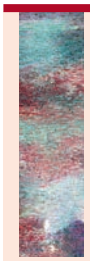


FIGURA 18.70
Reacciones terminales de degradación de la leucina.



APLICACIÓN CLÍNICA 18.10
Enfermedades del metabolismo de los aminoácidos ramificados

Las deficiencias enzimáticas en el catabolismo de los aminoácidos ramificados son raras. En general, estas enfermedades producen acidosis en los neonatos y niños afectados. Se han detectado muy raramente ejemplos de hipervalinemia e hiperleucina-isoleucinemia. Se ha sugerido que los dos tipos de enfermedades indican la existencia de aminotransferasas específicas para la valina y para la leucina e isoleucina o, alternativamente, que mutaciones pudieran alterar la especificidad de un enzima único. La anomalía más común es la deficiencia de actividad del complejo de la deshidrogenasa de cetoácidos ramificados. Existen diversas variantes, si bien todos los pacientes excretan los α-cetoácidos e hidroxiácidos ramificados correspondientes, así como otros productos secundarios; un producto de excreción no identificado es el responsable del olor característico que hace que este grupo se denomine enfermedad del jarabe de arce en la orina. Algunos casos responden a elevadas dosis de tiamina. Un gran porcentaje de los afectados muestran un serio retraso mental, cetoacidosis y una expectativa de vida corta. En algunos casos el tratamiento con dietas que reducen la cetoacidemia de cetoácidos ramificados parece ser efectivo. Se han constatado algunos ejemplos de enfermedades provocadas por la deficiencia enzimática en reacciones posteriores de estos aminoácidos ramificados. Entre ellas, se encuentran el bloqueo de la oxidación del isovaleril CoA con acumulación de isovalerato (que da a la orina un olor de pies sudados), la deficiencia de β-metilcrotonil-CoA carboxilasa (en la que la orina huele como la de un gato), la deficiencia de β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA liasa y la deficiencia de β-cetotiolasa, enzima que corta el α-metilacetoacetil CoA (sin afectar a la rotura del acetoacetato). En esta última enfermedad, el desarrollo es normal y los síntomas sólo parecen estar relacionados con episodios de cetoacidosis.

Zhang, B., Edenberg, H. J., Crabb, D. W. y Harris, R. A. Evidence for both a regulatory and structural mutation in a family with maple syrup urine disease. *J. Clin. Invest.* 83:1425, 1989.

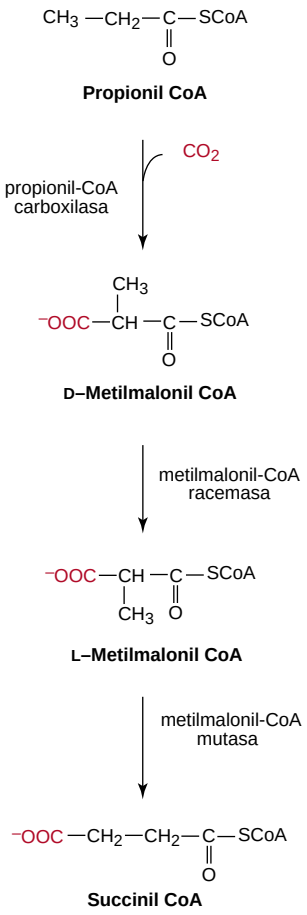
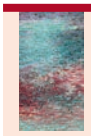


FIGURA 18.71
Interconversión de propionil CoA, metilmalonil CoA y succinil CoA. La mutasa necesita 5′-adenosilcobalamina para su actividad.



APLICACIÓN CLÍNICA 18.11
Enfermedades del metabolismo del propionato y del metilmalonato

Deficiencias en los tres enzimas mostrados en la Figura 18.71 contribuyen a una cetoacidosis. El propionato se forma durante la degradación de la valina, isoleucina, metionina, treonina y la cadena lateral del colesterol y de los ácidos grasos de cadena impar. Parece ser que los aminoácidos son los principales precursores, dado que cuando se reduce o elimina el contenido proteico de la dieta disminuye también inmediatamente la acidosis. El defecto de propionil-CoA carboxilasa provoca la acumulación de propionato que se desvía por rutas alternativas, que incluyen la incorporación a ácidos grasos en lugar de un grupo acetilo, para formar ácidos grasos de cadena impar. La importancia de estas reacciones es muy limitada. Se ha constatado un caso en que una elevada administración de biotina produjo efectos beneficiosos, lo cual sugeriría que la disminución de propionil-CoA carboxilasa viene provocada por más de un defecto. Existe la posibilidad de una falta de biotinidasa intestinal, que libera la biotina de los alimentos ingeridos para su absorción, o de una falta de biotina holocarboxilasa, que incorpora la biotina en los enzimas dependientes de biotina. Se han hallado casos de niños que padecían una acidosis provocada por unos niveles elevados de metilmalonato, compuesto que normalmente no se detecta en la sangre. Los análisis enzimáticos de hígados obtenidos en autopsias o de cultivos de fibroblastos mostraron que algunos de estos casos se debían a una deficiencia de metilmalonil-CoA mutasa. Un grupo era incapaz de convertir el metilmalonil CoA en succinil CoA, cualesquiera que fuesen las condiciones, mientras que el otro grupo podía efectuar esta conversión si se añadía el coenzima 5′-adenosilcobalamina. Evidentemente, los pacientes con un defecto en el centro activo del enzima son incapaces de metabolizar el metilmalonato, pero aquellos cuyo defecto se centra en la utilización de la vitamina B_{12} responden a dosis masivas de esta vitamina. Otros casos de aciduria metilmalónica provienen de una mayor incapacidad en la utilización de vitamina B_{12} lo que provoca una deficiencia de metilcobalamina (el coenzima de la recuperación de metionina) así como una deficiencia de 5′-adenosilcobalamina (el coenzima de la isomerización del metilmalonil CoA).

Mahoney, M. J. y Bick, D. Recent advances in the inherited methylmalonic acidemias. *Acta Paediatr. Scand.* 76:689, 1987.

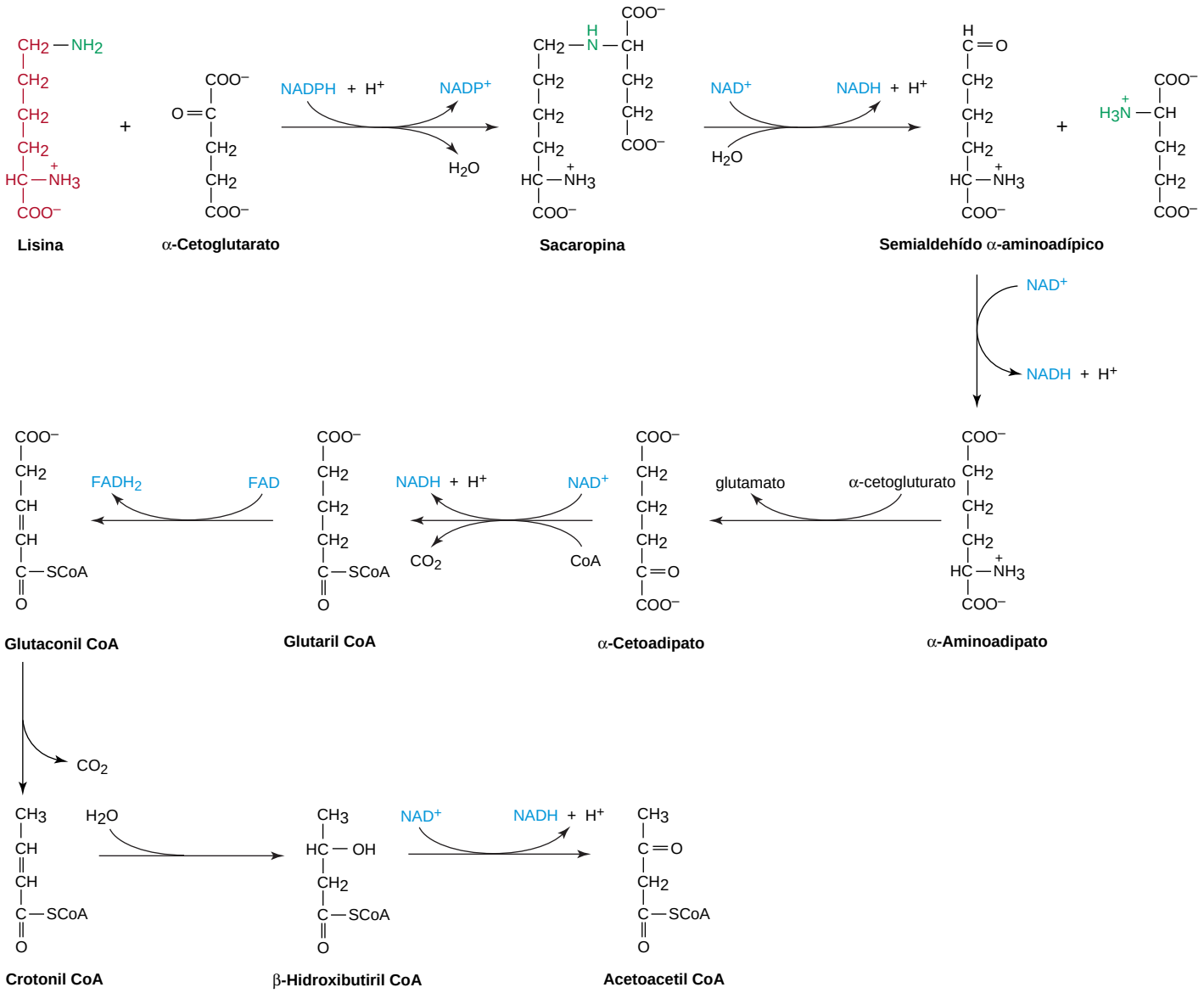


FIGURA 18.72
Ruta principal de degradación de la lisina.

tarato como aceptor y cosustrato (Figura 18.72). En lugar del mecanismo de tipo piridoxal fosfato–base de Schiff, se forma un intermediario denominado **sacaropina**, que a continuación se rompe dando glutamato y un compuesto de tipo semialdehído. El mecanismo usual de reordenamiento electrónico de la base de Schiff, es reemplazado por una oxidación y una reducción, pero los productos son exactamente los mismos. El semialdehído es entonces oxidado dando un aminoácido dicarboxílico, al tiempo que tiene lugar una transaminación del grupo α-amino, en una forma que depende del piridoxal fosfato. Otras reacciones conducen finalmente a acetoacetil CoA. Una ruta minoritaria se inicia con la eliminación del grupo α-amino, y transcurre a través del compuesto cíclico **pipecolato** (Figura 18.73), uniéndose a la ruta principal a nivel del intermediario semialdehído. Esta ruta no reemplaza a la ruta principal, incluso cuando existe una deficiencia de enzimas en las primeras etapas de la ruta (Apli. Clín. 18.12).

La carnitina proviene de la lisina

Los ácidos grasos de cadena media y larga son transportados a las mitocondrias, para su β-oxidación, en forma de conjugados de **carnitina** (véase p. 713). La carnitina no se sintetiza a partir de lisina libre sino a partir de residuos de lisina en determinadas proteínas. El primer paso es la trimetilación del grupo ϵ-amino de la ca-

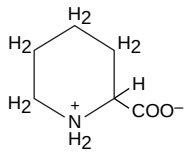


FIGURA 18.73
Producto minoritario del metabolismo de la lisina.

APLICACIÓN CLÍNICA 18.12
Enfermedades que implican a la lisina y la ornitina

Lisina

Se han descrito dos trastornos metabólicos de la lisina. En un pequeño número de pacientes que excretan lisina y cantidades menores de sacaropina existe una deficiencia de semialdehído α-amino adípico sintasa. Esto condujo al descubrimiento que el enzima posee actividad tanto lisina-α-cetoglutarato reductasa como sacaropina deshidrogenasa. Existen también proteínas con actividades enzimáticas múltiples en la síntesis de las pirimidinas y en la síntesis de ácidos grasos. Se cree que la hiperlisinemia es benigna. Más grave es la intolerancia proteica lisinúrica familiar, debida a la imposibilidad de transportar aminoácidos dibásicos a través de la mucosa intestinal y el epitelio tubular renal. Los niveles de lisina, arginina y ornitina en plasma descienden a un tercio o la mitad de los normales. Los pacientes desarrollan una marcada hiperamonemia después de una comida que contenga proteína. Se cree que esto es debido a la deficiencia en el hígado de los intermediarios del ciclo de la urea, ornitina y arginina, lo que limita la capacidad del ciclo. De forma coherente con esta hipótesis, el suplemento oral de citrulina previene la hiperamonemia. Otras características son el cabello fino, la merma muscular y la osteoporosis, que pueden ser el reflejo de la malnutrición proteica debida a la deficiencia de lisina y arginina.

Ornitina

Los niveles elevados de ornitina son generalmente debidos a la deficiencia de ornitina δ-aminotransferasa. La deficiencia de este enzima mitocondrial provoca una enfermedad perfectamente caracterizada clínicamente, la atrofia giratoria de la coroides y la retina, caracterizada por una pérdida progresiva de la visión que conduce a la ceguera hacia la cuarta década de vida. No se conoce el mecanismo de los cambios patológicos en los ojos. El avance de la enfermedad puede retardarse mediante la restricción de arginina en la dieta y/o la terapia con piridoxina, que reduce los niveles de ornitina en los fluidos corporales.

O'Donnell, J. J., Sandman, R. P. y Martin, S. R. Gyrate atrophy of the retina: inborn error of L-ornithine:2-oxoacid aminotransferase. *Science* 200:200, 1978; y Rajantic, J., Simell, O. y Perheentupa, J. Lysinuric protein intolerance. Basolateral transport defect in renal tubuli. *J. Clin. Invest.* 67:1078, 1981.

dena lateral de la lisina, con AdoMet como dador de metilo (Figura 18.74). La trimetil-lisina libre se obtiene por hidrólisis de estas proteínas, y es metabolizada en cuatro pasos a carnitina.

Histidina

La primera reacción, catalizada por la **histidasa** (Apli. Clín. 18.13), elimina amoníaco libre y deja un compuesto con un doble enlace llamado urocanato (Figura 18.75).

APLICACIÓN CLÍNICA 18.13
Histidinemia

La histidinemia es debida a una deficiencia de la histidasa. Un ensayo adecuado para este enzima utiliza la piel, que produce urocanato como un componente del sudor; la urocanasa y otros enzimas del catabolismo de la histidina que se hallan en el hígado no están presentes en la piel. Si el urocanato está ausente del sudor solamente puede interpretarse como una carencia de su síntesis, y no como una desaparición acelerada por su metabolismo posterior. La deficiencia de histidasa puede ser confirmada por ensayo del enzima en biopsias de piel. La incidencia del trastorno es elevada, cerca de 1 por cada 10 000 recién nacidos analizados. La mayoría de los casos conocidos de histidinemia mostraban un desarrollo mental normal. La restricción de histidina en la dieta normaliza las anomalías bioquímicas, aunque normalmente no es necesaria.

Scriver, C. R. y Levy, H. L. Histidinemia: reconciling retrospective and prospective findings. *J. Inherit. Metab. Dis.* 6:51, 1983.

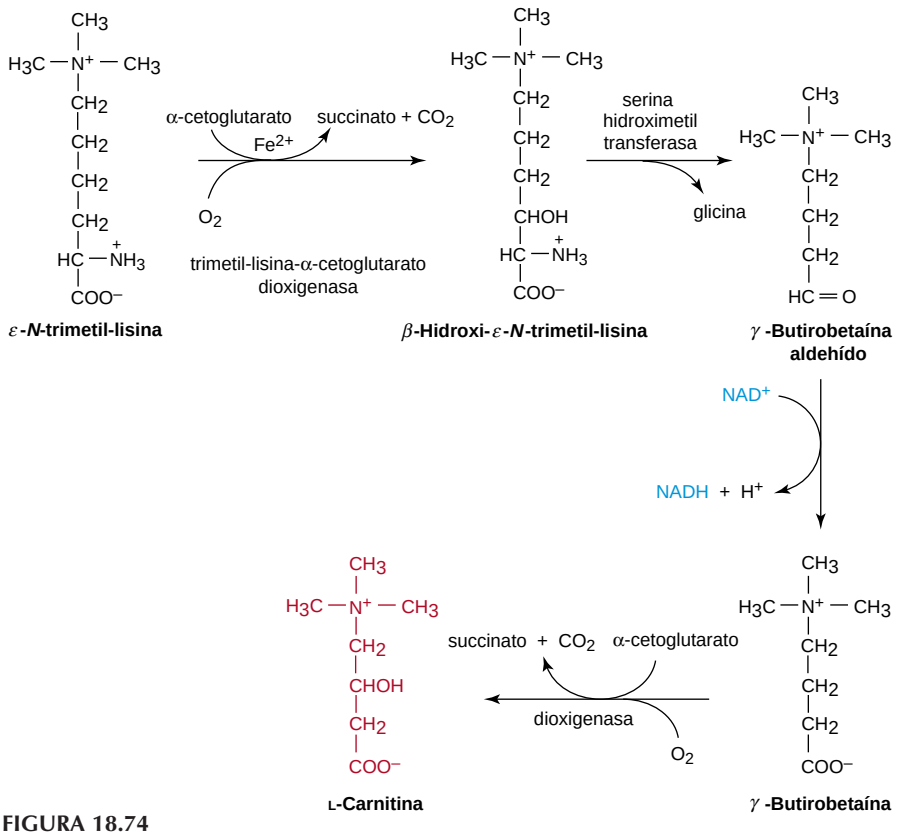


FIGURA 18.74
Biosíntesis de la carnitina.

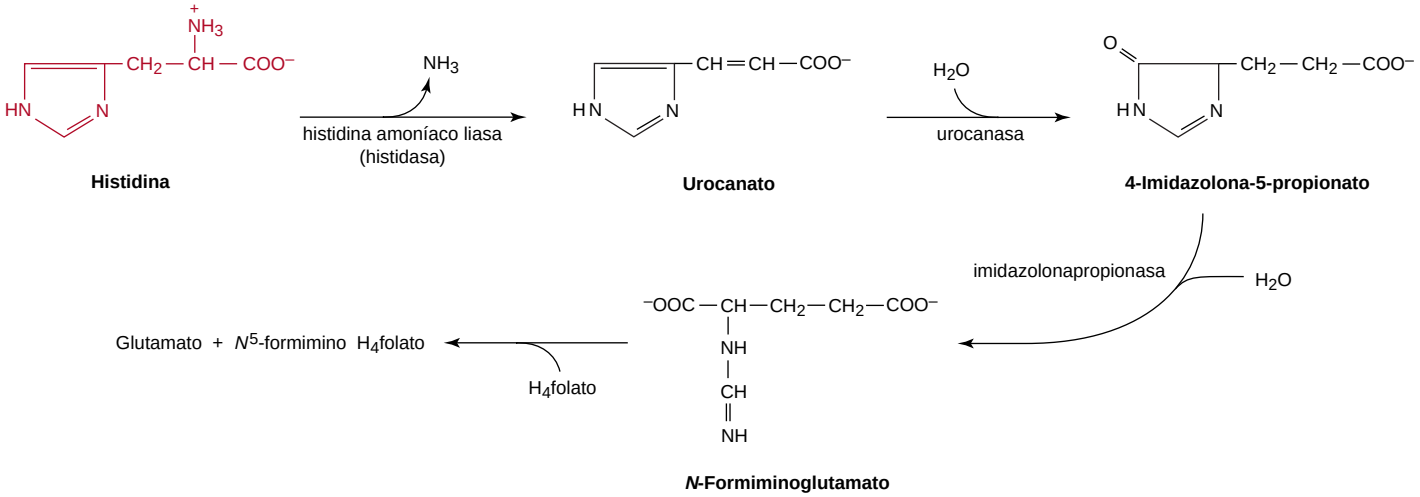


FIGURA 18.75
Degradación de la histidina.

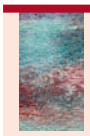
Otras dos reacciones conducen al **formiminoglutamato (FIGLU)**. El grupo formimino es entonces transferido al tetrahidrofolato.

El formiminoglutamato en orina aumenta en la deficiencia de folato

El grupo formimino del formiminoglutamato debe ser transferido al tetrahidrofolato para que pueda formarse el producto final, el glutamato. Cuando el tetrahidrofolato disponible es insuficiente, esta reacción disminuye y el FIGLU se excreta en la orina. Ésta es una señal diagnóstica de una deficiencia de folato, si tiene lugar después de ingerir una dosis de prueba de histidina (Apli. Clín. 18.14).

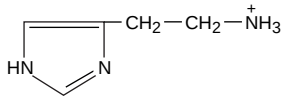
La histamina, carnosina y anserina son producidas a partir de la histidina

La **histamina** (Figura 18.76) liberada por las células como parte de una respuesta alérgica, se produce a partir de la histidina, por la **histidina descarboxilasa**. La histamina juega muchos papeles fisiológicos, entre los que se incluye la dilatación y constricción de ciertos vasos sanguíneos. Una sobrerreacción a la histamina puede conducir al asma y otras reacciones alérgicas. La **carnosina** (β-alanilhistidina) y la **anserina** (β-alanilmetilhistidina) son dipéptidos (Figura 18.77) que se hallan en el músculo y cuya función es desconocida.



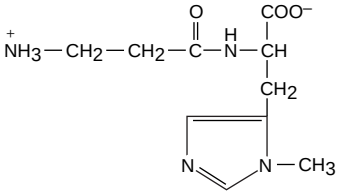
APLICACIÓN CLÍNICA 18.14
Enfermedades del metabolismo del folato

Una parte importante del ácido fólico que se absorbe debe reducirse para poder actuar como coenzima. Los síntomas de deficiencia de folato pueden deberse a la deficiencia de dihidrofolato reductasa. Para estos casos, un tratamiento efectivo consiste en la administración parenteral de N^5-formiltetrahidrofolato, el más estable de entre los folatos reducidos. En algunos casos una anomalía del sistema nervioso central atribuida a una deficiencia de metileno folato reductasa va acompañada de homocistinuria. El bajo nivel de la actividad enzimática disminuye la formación de N^5-metiltetrahidrofolato, de tal forma que queda limitada la cantidad de grupos metilo disponibles para la ruta de recuperación de homocisteína. Cuando se administran grandes cantidades de ácido fólico, betaína y metionina se revierten las anomalías bioquímicas, y, al menos en un caso, también los desórdenes neurológicos. Se han observado deficiencias en la transferencia del grupo formimino desde el formiminoglutamato al tetrahidrofolato en un conjunto de pacientes con sintomatologías divergentes. Estos pacientes excretaban cantidades variables de FIGLU; algunos respondían a la administración de grandes dosis de folato, pero otros no. No se conoce con claridad el mecanismo por el que la deficiencia de formiminotransferasa provoca alteraciones patológicas. No está del todo claro si esta deficiencia provoca realmente un estado de enfermedad. Un paciente con síntomas de deficiencia de folato poseía una deficiencia de tetrahidrofolato metiltransferasa. La anemia asociada no respondía a vitamina B_{12}, pero mejoró algo por administración de folato. Se sugirió que este paciente no producía suficiente N^5-metiltetrahidrofolato para promover la remetilación de la homocisteína. Esto dejaba el coenzima "atrapado" en la forma metilada y no disponible para su utilización en otras reacciones.

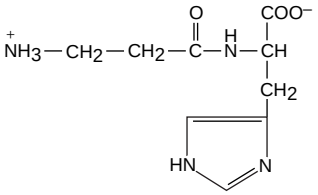


Histamina

FIGURA 18.76
Histamina.



Anserina



Carnosina

FIGURA 18.77
Anserina y carnosina.

Creatina

El almacenamiento de fosfato de "alta energía", especialmente en el músculo cardíaco y esquelético, tiene lugar por transferencia del grupo fosfato del ATP a la **creatina** (Figura 18.78). La creatina se sintetiza por transferencia del grupo guanidinio de la arginina a la glicina, y la posterior adición de un grupo metilo de la AdoMet. La cantidad de creatina en el organismo está relacionada con la masa muscular, renovándose cada día un porcentaje determinado. Alrededor del 1–2% del fosfato de creatina se cicla de forma no enzimática dando **creatinina** (Figura 18.79), que es excretada en la orina, y se sintetiza nueva creatina para reemplazarla. La cantidad de creatinina excretada por un individuo es por tanto constante de un día a otro. Cuando se recoge una muestra de orina de 24 horas, la cantidad de creatinina en la muestra puede utilizarse como indicativo de si la muestra representa verdaderamente la excreción urinaria de un día.

Glutatión

El **glutatión**, el tripéptido **γ-glutamilcisteinilglicina**, tiene varias funciones importantes. Es un reductor, unido a fármacos como conjugado los hace más solubles en agua, está involucrado en el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares, es parte de la estructura de algunos leucotrienos (véase p. 772), es un cofactor de algunas reacciones enzimáticas, y una ayuda para el reordenamiento de puentes disulfuro de proteínas. El glutatión como reductor es muy importante para mantener la estabilidad de la membrana de los eritrocitos. Su grupo sulfhidrilo puede ser utilizado para reducir peróxidos formados durante el transporte de oxígeno (véase p. 592). La forma oxidada resultante del GSH consiste en dos moléculas unidas por un puente disulfuro. Ésta es reducida de nuevo a dos moléculas de GSH a expensas de NADPH (Figura 18.80). El cociente GSH a GSSG en estado es-

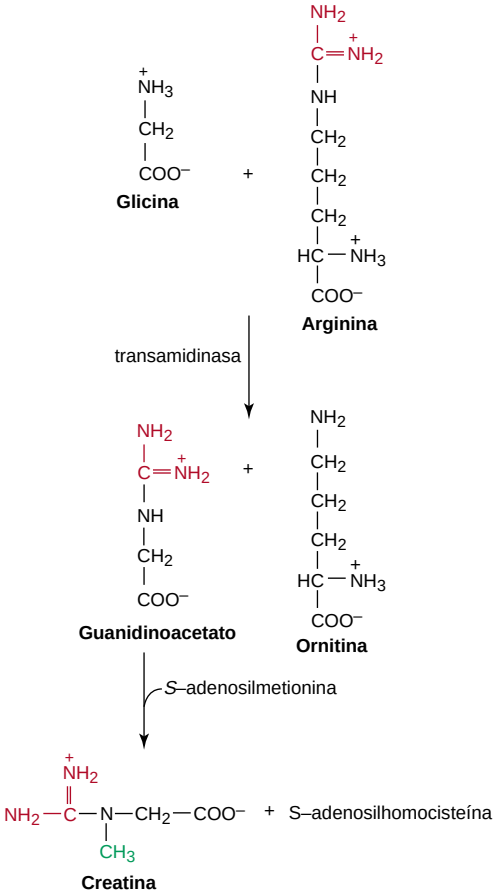


FIGURA 18.78
Síntesis de la creatina.

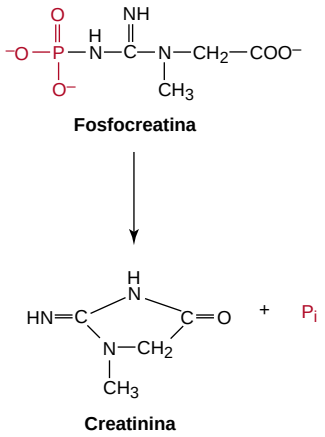


FIGURA 18.79
Reacción espontánea de formación de la creatinina.

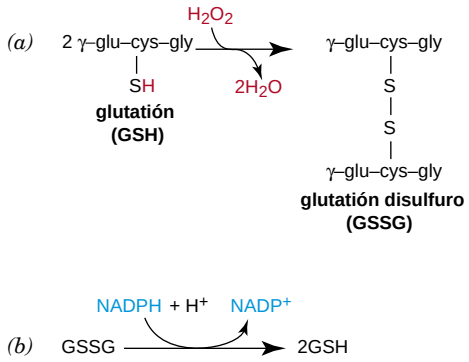


FIGURA 18.80
(*a*) Eliminación del peróxido por la glutatión peroxidasa y (*b*) regeneración del glutatión reducido por la glutatión reductasa.

tacionario normal en los eritrocitos es 100:1. La conjugación de fármacos por el glutatión, que sigue a menudo a una reacción preliminar catalizada por el citocromo P450 (véase el Capítulo 11), los vuelve más polares para su excreción (Figura 18.81).

El glutatión se sintetiza a partir de tres aminoácidos

El glutatión se sintetiza por formación del dipéptido **γ**-glutamilcisteína seguida de la adición de glicina. Ambas reacciones requieren la activación de los grupos carboxílicos por ATP (Figura 18.82). La síntesis del glutatión está regulada en gran parte por la disponibilidad de cisteína.

El ciclo del γ-glutamilo transporta aminoácidos

Existen diversos mecanismos para el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares. Muchos de ellos son mecanismos de cotransporte paralelo (symport) o antiparalelo (antiport) (véase p. 526) y están acoplados al transporte de sodio. El **ciclo del γ-glutamilo** es un ejemplo de transporte por "transferencia de grupo". Requiere más energía que otros mecanismos, pero es rápido y tiene una gran capacidad, y funciona en el riñón y en algunos otros tejidos. Es especialmente importante en las células del epitelio renal. El enzima **γ-glutamil transpeptidasa** está localizado en la membrana celular y hace de lanzadera de GSH hacia la superficie celular para que interaccione con un aminoácido. El γ-glutamilaminoácido es transportado al interior de la célula y el complejo es hidrolizado para liberar el aminoácido (Figura 18.83). El glutamato se libera como **5-oxoprolina**, y la cisteinilglicina se rompe en los aminoácidos que la componen. Para regenerar el GSH, el glutamato vuelve a formarse a partir de la oxoprolina, en una reacción que requiere ATP, y se vuelve a sintetizar el GSH a partir de sus tres partes componentes. En la regeneración del glutatión se utilizan tres ATP, uno en la formación del glutamato a partir de la oxoprolina, y dos en la formación de los enlaces peptídicos.

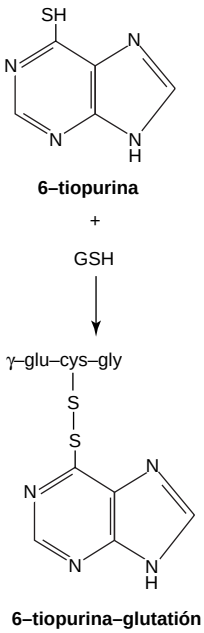


FIGURA 18.81
Conjugación de un fármaco por la glutatión transferasa.

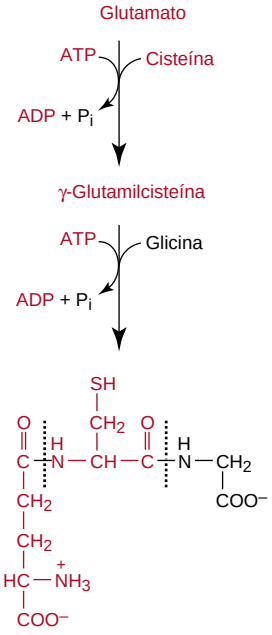


FIGURA 18.82
Síntesis del glutatión.

La concentración de glutatión afecta a la respuesta a toxinas

Cuando el organismo hace frente a condiciones tóxicas, tales como la formación de peróxidos, radiación ionizante, agentes alquilantes, u otros intermediarios reactivos, es beneficioso incrementar el nivel de GSH. La cisteína y la metionina se han suministrado como precursores del GSH, pero tienen la desventaja de ser precursores de una ruta de formación de GSH muy cara en energía. Un enfoque más prometedor es la administración de un diéster soluble del GSH, tal como el γ-(α-etil)glutamilcisteinilglicinato.

Los niños muy prematuros tienen una concentración muy baja de cisteína debido a la baja actividad cistationasa del hígado. Esto hace que se mantenga baja la concentración de GSH y los hace más susceptibles al daño oxidante, especialmente por los hidroperóxidos formados en el ojo tras un tratamiento con oxígeno hiperbárico. En determinadas circunstancias, como por ejemplo para hacer que las células tumorales sean más sensibles a la radiación o los parásitos más sensibles a los fármacos, es deseable mantener los niveles de GSH bajos. Esto puede conseguirse con el análogo del glutamato **butionina sulfoximina** (Figura 18.84), como inhibidor competitivo de la síntesis de GSH.

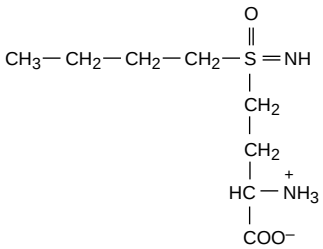


FIGURA 18.84
Butionina sulfoximina.

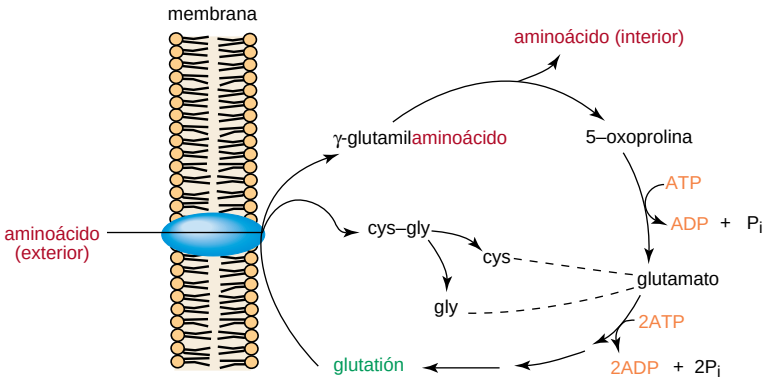


FIGURA 18.83
Ciclo del γ-glutamilo para el transporte de aminoácidos.

BIBLIOGRAFÍA

General

Meister, A. *Biochemistry of the Amino Acids,* 2nd ed. New York: Academic Press, 1965.

Piridoxal fosfato

Dolphin, P., Poulson, R. y Avramovic, O. (Eds.). *Vitamin B_6 Pyridoxal Phosphate.* New York: Wiley, 1986.

Glutamato y glutamina

Bode, B. L., Kaminski, D. L., Souba, W. W. y Li, A. P. Glutamine transport in human hepatocytes and transformed liver cells. *Hepatology* 21:511, 1995.

Fisher, H. F. Glutamate dehydrogenase. *Methods Enzymol.* 113:16, 1985.

Haussinger, D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem. J.* 267:281, 1990.

Ciclo de la urea

Holmes, F. L. Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Fed. Proc.* 39:216, 1980.

Jungas, R. L., Halperin, M. L. y Brosnan, J. T. Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol. Rev.* 72:419, 1992.

Aminoácidos de cadena ramificada

Shander, P., Wahren, J., Paoletti, R., Bernardi, R. y Rinetti, M. *Branched Chain Amino Acids.* New York: Raven Press, 1992.

Serina

Snell, K. The duality of pathways for serine biosynthesis is a fallacy. *Trends Biochem. Sci.*11:241, 1986.

Arginina

Reyes, A. A., Karl, I. E. y Klahr, S. Editorial review: role of arginine in health and renal disease. *Am. J. Physiol.* 267:F331, 1994.

Aminoácidos sulfurados

Lee, B. J., Worland, P. J., Davis, J. N., Stadtman, T. C. y Hatfield, D. L. Identification of a selenocysteyl-tRNASer in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J. Biol. Chem.* 264:9724, 1989.

Stepanuk, M. H. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu. Rev. Nutr.* 6:179, 1986.

Wright, C. E., Tallan, H. H., Lin, Y. Y. y Gaull, G. E. Taurine: biological update. *Annu. Rev. Biochem.* 55:427, 1986.

Poliaminas

Perin, A., Scalabrino, G., Sessa, A. y Ferioloini, M. E. *Perspectives in Polyamine Research.* Milan: Watchdog Editors, 1988.

Tabor, C. W. y Tabor, H. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53:749, 1984.

Folatos y pterinas

Blakley, R. L. y Benkovic, S. J. *Folate and Pterins.* New York: Wiley, Vol. 1: 1984, Vol. 2, 1985.

Quinoproteínas

Davidson, V. L. (Ed.). *Principles and Applications of Quinoproteins.* New York: Marcel Dekker, 1993.

Carnitina

Bieber, L. L. Carnitine. *Annu. Rev. Biochem.* 57:261, 1988.

Glutatión

Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y. y Meister, A. *Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Implications.* New York: Academic Press, 1989.

Triptófano

Stone, T. W. *Quinolinic Acid and the Kynurenines.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.

Schwarcz, R. Metabolism and function of brain kynurenines. *Biochem. Soc. Trans.* 21:77, 1993.

Enfermedades del metabolismo de los aminoácidos

Rosenberg, L. E. y Scriver, C. R. Disorders of amino acid metabolism. En: P. K. Bondy y L. E. Rosenberg (Eds.), *Metabolic Control and Disease,* 8th ed. Philadelphia: Saunders, 1980.

Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. y Valle, D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

Wellner, D. y Meister, A. A survey of inborn errors of amino acid metabolism and transport. *Annu. Rev. Biochem.* 50:911, 1980.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Los aminoácidos considerados no esenciales para el hombre son:
   A. aquellos que no se incorporan a las proteínas.
   B. los que no se necesitan en la dieta si hay suficiente cantidad de sus precursores.
   C. los mismos para los adultos que para los niños.
   D. los que se fabrican en proteínas específicas por modificaciones post-traducción.
   E. los que no son suministrados por las dietas ordinarias.

2. Las aminotransferasas:
   A. requieren habitualmente α-cetoglutarato o glutamina como uno de los miembros del par de reacción.
   B. catalizan reacciones que originan un gasto o producción neta de aminoácidos.
   C. catalizan reacciones irreversibles.
   D. necesitan piridoxal fosfato como cofactor esencial de la reacción.
   E. no son capaces de catalizar las reacciones de transaminación de aminoácidos esenciales.

3. La producción de amoníaco en la reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa:
   A. requiere la participación de NADH o NADPH.
   B. se produce a través de una base de Schiff como intermediario.
   C. puede invertirse de modo que consuma amoníaco, si éste se encuentra en exceso.
   D. se ve favorecida por niveles elevados de ATP o GTP.
   E. se encuentra inhibida cuando la gluconeogénesis es activa.

4. El nitrógeno amídico de la glutamina:
   A. constituye una forma no tóxica de transporte del amoníaco.
   B. es una fuente principal de amoníaco para excreción por la orina.
   C. se emplea para la síntesis de asparagina, purinas y pirimidinas.

D. puede reconvertirse en amoníaco por acción de la glutaminasa.
E. todas las anteriores son correctas.

5. Todo lo siguiente es correcto para la ornitina, EXCEPTO:
   A. puede convertirse en semialdehído glutámico o formarse a partir de él.
   B. puede ser convertida en prolina.
   C. desempeña un papel importante en el ciclo de la urea.
   D. es un precursor de la putrescina, una poliamina.
   E. está en equilibrio con la espermidina.

6. La *S*-adenosilmetionina:
   A. contiene un azufre cargado positivamente (sulfonio) que facilita la transferencia de sustituyentes a aceptores adecuados.
   B. en la reacción en la que se transfiere el metilo conduce al α-cetobutirato.
   C. dona un grupo metilo en una reacción completamente reversible.
   D. por transulfuración genera H_2S.
   E. proporciona los carbonos para la formación de la cisteína.

7. En el hombre, el azufre de la cisteína puede participar en todos los procesos siguientes EXCEPTO:
   A. la conversión de cianuro a la forma menos tóxica tiocianato.
   B. formación de tiosulfato.
   C. formación de taurina.
   D. donación de azufre para la formación de metionina.
   E. formación de PAPS.

8. La lisina como nutriente:
   A. puede reemplazarse por su α-cetoácido análogo.
   B. en su ruta catabólica produce piruvato y acetoacetil CoA.
   C. es metilada por la *S*-adenosilmetionina.
   D. es el único de los aminoácidos comunes precursor de la carnitina.
   E. todo lo anterior es correcto.

9. La histidina:
   A. contrariamente a la mayoría de los aminoácidos, no se convierte en un α-cetoácido cuando se le elimina el grupo amino.
   B. contribuye a la reserva de unidades monocarbonadas del tetrahidrofolato.
   C. produce una amina fisiológicamente activa por descarboxilación.
   D. forma un péptido con la β-alanina.
   E. todas las anteriores son correctas.

10. El glutatión cumple todo lo siguiente EXCEPTO:
    A. participa en el transporte de aminoácidos a través de algunas membranas celulares.
    B. elimina peróxidos y radicales libres.
    C. forma conjugados sulfurados para la destoxificación de compuestos.
    D. convierte la hemoglobina en methemoglobina.
    E. actúa como cofactor de algunos enzimas.

Preguntas 11 y 12: Los defectos en el metabolismo de los aminoácidos de cadena lateral ramificada son raros pero graves. El más frecuente se denomina enfermedad del jarabe de arce en la orina (así denominada por el olor de la orina), que se debe a una deficiencia del complejo de la cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa. La enfermedad se caracteriza por retraso mental, cetoacidosis y una vida corta.

11. Todo lo siguiente es cierto para los aminoácidos de cadena ramificada, EXCEPTO:
    A. son esenciales en la dieta.
    B. se diferencian en que uno es glucogénico, uno es cetogénico y uno se clasifica como ambos.
    C. se catabolizan de una forma que guarda semejanza con la β-oxidación de los ácidos grasos.
    D. son oxidados por un complejo deshidrogenasa a un acil CoA de cadena ramificada un carbono más corto que el compuesto de partida.
    E. son metabolizados inicialmente en el hígado.

12. La valina y la isoleucina forman propionil CoA, precursor del succinil CoA. La aciduria metilmalónica es una enfermedad relacionada con un defecto en esta conversión. Algunos pacientes responden a megadosis de vitamina B_{12}. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones sobre la conversión de propionil CoA en succinil CoA es/son correcta/s?:
    A. el primer paso de la conversión es una carboxilación dependiente de biotina.
    B. algunos pacientes de aciduria metilmalónica responden a la B_{12} porque el defecto de la mutasa que convierte el metilmalonil CoA en succinil CoA es una débil fijación del cofactor.
    C. la misma ruta de propionil CoA a succinil CoA es parte del metabolismo de los ácidos grasos de cadena impar.
    D. Todo lo anterior es correcto.
    E. Nada de lo anterior es correcto.

Preguntas 13 y 14: La hiperamonemia producida por deficiencias en los enzimas implicados en la síntesis de carbamil fosfato o cualquiera de los enzimas del ciclo de la urea es una enfermedad muy grave. Si no se trata produce una muerte temprana o, si el paciente sobrevive, hay retraso mental y otras anomalías del desarrollo. La deficiencia de ornitina transcarbamilasa es el error más frecuente del ciclo. Un enfoque principal para su tratamiento son las medidas para aliviar la hiperamonemia y, a veces, la suplementación con arginina.

13. En la formación de urea a partir del amoníaco todo lo siguiente es correcto, EXCEPTO:
    A. el aspartato aporta uno de los nitrógenos de la urea.
    B. parte de la gran variación de energía libre negativa del proceso puede atribuirse a la hidrólisis del pirofosfato.
    C. la velocidad del ciclo es independiente de la dieta.
    D. se produce fumarato.
    E. la ornitina transcarbamilasa cataliza el paso limitante de velocidad.

14. La carbamil fosfato sintetasa I:
    A. es una flavoproteína.
    B. está controlada fundamentalmente por retroinhibición.
    C. no responde a los cambios en la arginina.
    D. requiere como efector alostérico el acetilglutamato.
    E. requiere como efector alostérico el ATP.

Problemas

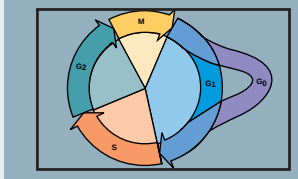
15. ¿Qué efectos específicos tendría una incapacidad de generar tetrahidrobiopterina sobre el metabolismo de fenilalanina, tirosina y triptófano?

16. Además de retraso mental, los pacientes sin tratar de fenilcetonuria, tienen una producción disminuida de catecolaminas y piel y pelo claros. Si el defecto se encuentra en la misma fenilalanina hidroxilasa, una dieta que carezca de fenilalanina pero que contenga tirosina alivia estas condiciones. Si el defecto se encuentra en la capacidad de producir tetrahidrobiopterina el mismo tratamiento con la dieta puede aliviar el retraso mental y el cabello claro pero no la producción disminuida de catecolaminas. ¿Cuáles son los motivos que explican estos hallazgos?

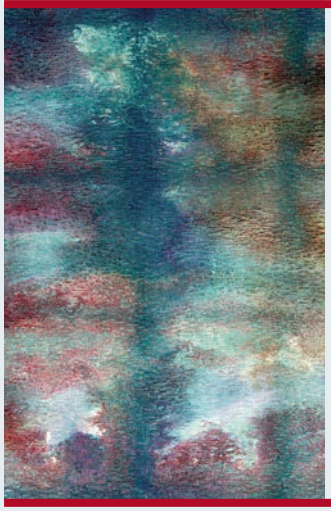
17. Si se utiliza serina marcada con ^{14}C en el carbono portador del grupo hidroxilo como fuente de grupos monocarbonados, ¿de qué modo este carbono marcado se transforma en el grupo metilo marcado de la adrenalina? Sea concreto.

RESPUESTAS

1. **B** B, E: Aunque la mayor parte de nuestro suministro de aminoácidos no esenciales proviene de la dieta, podemos sintetizarlos, si ello es necesario, si se dispone de precursores. A: Los 20 aminoácidos comunes se incorporan a las proteínas. C: No se cree que los adultos tengan una necesidad de arginina. D: Estos son aminoácidos para los que no existen codones.
2. **D** El mecanismo de acción empieza con la formación de una base de Schiff con el piridoxal fosfato. A: La mayoría de las aminotransferasas de mamíferos emplean glutamato o α-cetoglutarato. B: Un aminoácido se convierte en otro; no hay pérdida ni ganancia neta. C: las reacciones son libremente reversibles. E: solamente la lisina y la treonina carecen de aminotransferasas
3. **C** Este es un mecanismo importante para reducir las concentraciones del amoníaco, que es tóxico. A: Éstos favorecerían el consumo de amoníaco. B: El cofactor es un nucleótido piridínico, no piridoxal fosfato. D: Éstos son inhibidores. E: Puesto que parte de su papel es proporcionar las cadenas carbonadas de aminoácidos para la gluconeogénesis, ésta estará activa.
4. **E** La mayor parte del nitrógeno de los aminoácidos se encuentra disponible en la forma no tóxica del nitrógeno amídico de la glutamina. D: La glutamina libera el amoníaco en el hígado y en el riñón.
5. **E** La espermidina se forma por adición de propilamina a la putrescina. A y B: Los dos aminoácidos dan lugar al semialdehído glutámico, y se forman a partir de éste. C: Es tanto un sustrato como un producto del ciclo. D: Se trata de una descarboxilación.
6. **A** El azufre cargado positivamente es reactivo y se vuelve a convertir en el tioéter neutro cuando el grupo metilo se transfiere a un aceptor. B: El producto, la *S*-adenosilhomocisteína, se hidroliza y se convierte en homocisteína. C: Las transmetilaciones a partir de AdoMet son irreversibles. D: La transulfuración se refiere a la acción combinada de la cistationina sintasa y la cistationasa en la transferencia del azufre de la metionina a la serina para producir cisteína. E: La metionina proporciona únicamente el azufre; los carbonos son de la serina.
7. **D** La metionina es la fuente de azufre para la cisteína (a través de la homocisteína), aunque lo inverso no es cierto en el ser humano. A y B: La transaminación a β-mercaptopiruvato con la formación posterior de tiosulfato y/o la conversión de cisteína a tiocisteína permite la transferencia de azufre para la destoxificación del cianuro. C: La taurina es la cisteína desaminada. E: El ion SO_4^{2-}, la forma más oxidada en que se encuentran el azufre fisiológico, es o bien excretado, o bien activado en forma de PAPS para su utilización biosintética o en la destoxificación de compuestos fenólicos.
8. **D** La lisina libre no se metila, pero los residuos lisilo en las proteínas se metilan en una modificación post-traducción. Los intermediarios de la síntesis de carnitina provienen de la trimetil-lisina liberada por proteólisis: A: La lisina no participa en reacciones de transaminación debido probablemente a que su α-cetoácido se encuentra en forma de base de Schiff cíclica. B: Éste es uno de los dos aminoácidos puramente cetogénicos. C: Véase más arriba.
9. **E** A: La eliminación de amoníaco de la histidina produce un doble enlace (urocanato), a diferencia de las reacciones de transaminación y desaminación oxidativa. B: Una parte del anillo se libera como formimino THF. C y D: La carnosina es la β-alanilhistidina y la anserina es la β-alanilmetilhistidina.
10. **D** La mayoría de las funciones del glutatión que se enumeran dependen de la presencia del grupo sulfhidrilo (—SH). Una de las funciones principales del glutatión en los eritrocitos es la reducción de la methemoglobina. La glutatión reductasa ayuda a mantener la relación de GSH a GSSG alrededor de 100 a 1.
11. **E** A: La BCAA aminotransferasa, el primer enzima, está a una concentración mucho más elevada en el músculo que en el hígado. B, C y D: Aunque su catabolismo es similar, los productos finales son diferentes debido a las diferencias en las ramificaciones. Después de la transaminación, los α-cetoácidos son oxidados por un complejo deshidrogenasa de manera similar a la piruvato deshidrogenasa. La semejanza con la β-oxidación está en pasos tales como la oxidación a un CoA α,β-insaturado, la hidratación del doble enlace, y la oxidación de un grupo hidroxilo a carbonilo.
12. **D** A: Esta es una reacción típica de carboxilación como la de la piruvato carboxilasa. B: Se han utilizado megadosis de un cofactor en una serie de enfermedades si el defecto está en la unión. Esta es una de las dos reacciones que utilizan B_{12}. C: La rotura final de los ácidos grasos de cadena impar produce propionil CoA.
13. **E** La carbamil fosfato sintetasa I cataliza el paso limitante de velocidad. A, B y D: El aspartato aporta uno de los nitrógenos, mientras que sus carbonos se liberan como fumarato. Esta reacción es fisiológicamente irreversible debido a la hidrólisis del pirofosfato. C: La concentración de CPSI y la síntesis de *N*-acetilglutamato aumentan con el aumento de proteína en la dieta.
14. **D** El control primario se ejerce mediante un efector alostérico, el *N*-acetilglutamato. B: Esto es una activación, no una inhibición. C: La síntesis del efector, y en consecuencia la actividad de la CPSI, aumenta en presencia de arginina. E: El ATP es un sustrato.
15 La tetrahidrobiopterina es necesaria como cofactor de las hidroxilasas de fenilalanina, tirosina y triptófano. Su deficiencia inhibiría la degradación normal tanto de fenilalanina como de tirosina puesto que sus rutas degradativas empiezan con las hidroxilasas respectivas. La formación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) empieza con la síntesis de DOPA a partir de la tirosina a través de la tirosina hidroxilasa por lo que se inhibiría la síntesis de catecolaminas. El paso inicial en la conversión del triptófano en serotonina está catalizado por la triptófano hidroxilasa.
16 El retraso mental parece provocado por los elevados niveles de fenilalanina en la sangre por lo que la eliminación de la fenilalanina de la dieta es beneficiosa. La piel y el pelo claros es un efecto secundario de la competencia de la fenilalanina con la tirosina por la tirosinasa, no un defecto enzimático, que es necesaria para formar melaninas. También podría contribuir una concentración baja de tirosina debido a la dificultad de convertir fenilalanina en tirosina. Dado que hay poca tirosina está afectada la producción de catecolaminas. Si el defecto se halla en la producción de tetrahidrobiopterina, la dieta es menos efectiva debido a que la tirosina hidroxilasa que conduce a DOPA (primer paso en la formación de catecolaminas) es dependiente de tetrahidrobiopterina.
17 La serina dona el carbono marcado al tetrahidrofolato para convertirlo en N^5,N^{10}–metilenotetrahidrofolato marcado. Este se reduce a N^5-metiltetrahidrofolato marcado el cual reacciona con homocisteína en presencia de vitamina B_{12} produciendo metionina marcada en el metilo. Después de activación a AdoMet, la metionina dona este metilo marcado a la noradrenalina dando adrenalina.



19



METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS Y PIRIMIDÍNICOS

Joseph G. Cory

19.1 VISIÓN GENERAL 826

19.2 FUNCIONES METABÓLICAS DE LOS NUCLEÓTIDOS 826

La distribución de nucleótidos varía con el tipo celular 827

19.3 QUÍMICA DE LOS NUCLEÓTIDOS 828

Propiedades de los nucleótidos 828

19.4 METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS 830

Los nucleótidos purínicos se sintetizan por una construcción a pasos del anillo que conduce al IMP 830
El IMP es el precursor común del AMP y el GMP 833
La síntesis de nucleótidos purínicos está altamente regulada 833
Las bases y nucleósidos purínicos se recuperan para volver a formar nucleótidos 834
Los nucleótidos purínicos se interconvierten para mantener un equilibrio celular adecuado entre los nucleótidos de adenina y guanina 835
El GTP es el precursor de la tetrahidrobiopterina 837
La degradación de purinas en el ser humano conduce a ácido úrico como producto final 837
Formación de ácido úrico 839

19.5 METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PIRIMIDÍNICOS 839

Los nucleótidos pirimidínicos se sintetizan mediante una secuencia de reacciones que conduce al UMP 839
La síntesis de nucleótidos pirimidínicos en el hombre está regulada a nivel de la carbamil fosfato sintetasa II 842
Las bases pirimidínicas se recuperan para volver a formar nucleótidos 843

19.6 FORMACIÓN DE DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS 843

Los desoxirribonucleótidos se forman por reducción de los ribonucleósidos difosfato 844
La síntesis de desoxitimidilato requiere N^5,N^{10}-metileno H_4folato 845
Interconversiones pirimidínicas, con especial énfasis en los nucleósidos y nucleótidos desoxirribopirimidínicos 846
Los nucleótidos pirimidínicos se degradan a β-aminoácidos 846

19.7 NUCLEÓSIDO Y NUCLEÓTIDO QUINASAS 848

19.8 ENZIMAS METABOLIZANTES DE NUCLEÓTIDOS EN FUNCIÓN DEL CICLO CELULAR Y DE LA VELOCIDAD DE DIVISIÓN CELULAR 848

Los niveles de los enzimas de la síntesis de nucleótidos purínicos y pirimidínicos se elevan durante la fase S 849

19.9 SÍNTESIS DE COENZIMAS NUCLEOTÍDICOS 850

19.10 SÍNTESIS Y UTILIZACIÓN DEL 5-FOSFORRIBOSIL-1-PIROFOSFATO 853

19.11 COMPUESTOS QUE OBSTACULIZAN EL METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS Y PIRIMIDÍNICOS: SU UTILIZACIÓN COMO AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS 854

Los antimetabolitos son análogos estructurales de las bases o nucleósidos 854
Los antifolatos inhiben la formación de tetrahidrofolato 855
Los antagonistas de la glutamina inhiben los enzimas que utilizan glutamina como dador de nitrógeno 856
Otros agentes inhiben el crecimiento celular al interferir con el metabolismo de los nucleótidos 856
Análogos de purinas y pirimidinas como agentes antivíricos 857
Bases bioquímicas del desarrollo de la resistencia a fármacos 857

BIBLIOGRAFÍA 858

PREGUNTAS 858

RESPUESTAS 860

APLICACIONES CLÍNICAS

19.1 Gota 834
19.2 Síndrome de Lesch–Nyhan 836

19.3 Actividad 5′-nucleotidasa citosólica incrementada 839
19.4 Enfermedades inmunodeficientes asociadas con defectos en la degradación de los nucleótidos purínicos 839
19.5 Pacientes de cáncer que están sujetos a radiación o a tratamiento quimioterapéutico 840
19.6 Subclase de pacientes con autismo 840
19.7 Aciduria orótica hereditaria 842

19.1 VISIÓN GENERAL

El contenido de este capítulo se limita a las células de mamíferos y, en lo posible, al metabolismo de nucleótidos en los seres humanos. Existen diferencias importantes entre el metabolismo de los nucleótidos en las bacterias y las células de mamíferos, e incluso algunas diferencias entre el ser humano y otros animales. Los nucleótidos purínicos y pirimidínicos participan en muchas funciones celulares críticas. Las funciones metabólicas de los nucleótidos comprenden desde servir de precursores monoméricos del RNA y DNA, a servir como segundos mensajeros. Las fuentes de nucleótidos purínicos y pirimidínicos son las rutas de síntesis *de novo* y el reciclaje de nucleobases y nucleósidos exógenos y endógenos. Los aminoácidos, el CO_2 y la ribosa-5-fosfato (de la ruta de las pentosas osfato) se utilizan como fuentes de los átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno de los nucleótidos purínicos y pirimidínicos.

Las concentraciones intracelulares de nucleótidos están reguladas muy finamente mediante una serie de enzimas controlados alostéricamente y situados en las rutas en que los productos finales nucelotídicos controlan pasos clave en la ruta. Los 2′-desoxirribonucleótidos necesarios para la replicación del DNA se generan directamente a partir de los ribonucleótidos, y su producción está también cuidadosamente controlada por nucleótidos, a través de su actuación como efectores positivos o negativos. Además de la regulación del metabolismo de los nucleótidos vía regulación alostérica, las concentraciones de enzimas clave en la ruta metabólica se alteran a lo largo del ciclo celular. Muchos de los incrementos de actividad enzimática tienen lugar durante la fase G1 tardía/inicio de la fase S, justo antes de la replicación del DNA.

Existen diversas enfermedades o síndromes que son el resultado de defectos en las vías metabólicas para la síntesis de nucleótidos bien *de novo*, bien de reciclaje, o bien para la degradación de nucleótidos. Entre ellas se encuentran la gota (defecto en la síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos), el síndrome de Lesch–Nyhan (defecto en el reciclaje de las nucleobases purínicas), la aciduria orótica (defecto en la síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos) y enfermedades de inmunodeficiencia (defectos en la degradación de nucleósidos purínicos). Dado que la síntesis de nucleótidos es indispensable para la replicación del DNA y la síntesis de RNA en las células en división, los fármacos que bloquean las rutas de síntesis *de novo* de nucleótidos se han utilizado con éxito como agentes antitumorales y antivíricos.

19.2 FUNCIONES METABÓLICAS DE LOS NUCLEÓTIDOS

Los nucleótidos y sus derivados desempeñan diversos papeles fundamentales en el metabolismo celular. En las células de mamíferos se encuentran muchos tipos diferentes de nucleótidos. Algunos, como el ATP, están presentes en concentraciones del orden milimolar, mientras que otros, como el AMP cíclico, están en concentraciones varios órdenes de magnitud menores. Las funciones de los nucleótidos incluyen las siguientes:

1. Papel en el **metabolismo energético**: Tal como se ha visto en capítulos anteriores, el ATP es la principal forma de energía química asequible a la célula. El ATP se genera en las células mediante la fosforilación oxidativa o la fosforilación a nivel de sustrato. El ATP se utiliza, como un agente fosforilante, para impulsar las reacciones metabólicas y está implicado en procesos como la contracción muscular, transporte activo y mantenimiento de los gradientes iónicos. El ATP se utiliza también como dador del fosfato necesario para la generación de los otros nucleósidos 5′-trifosfato.
2. **Unidades monoméricas de los ácidos nucleicos**: El DNA y RNA consisten en secuencias de nucleótidos. Los nucleósidos 5′-trifosfatos son los sustratos para las reacciones catalizadas por las RNA y DNA polimerasas.
3. **Mediadores fisiológicos**: Los nucleótidos y nucleósidos actúan como mediadores fisiológicos de procesos metabólicos clave. La adenosina es importante en la

regulación del flujo sanguíneo coronario; el ADP es crítico para la agregación de las plaquetas y, por tanto, para la coagulación de la sangre; el cAMP y cGMP actúan como segundos mensajeros; el GTP es necesario para la formación del casquete del mRNA, la transducción de señales mediante proteínas de unión al GTP, y la formación de microtúbulos.

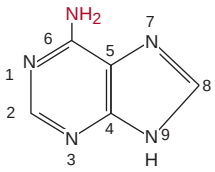
4. **Función como precursores**: el GTP es el precursor en la formación del cofactor tetrahidrobiopterina, necesario para algunas reacciones de hidroxilación y para la generación de óxido nítrico.
5. **Componentes de coenzimas**: Coenzimas tales como el NAD^+, $NADP^+$, FAD, sus formas reducidas y el coenzima A contienen como parte de sus estructuras una porción 5′-AMP.
6. **Intermediarios activados**: Los nucleótidos también sirven como portadores de intermediarios "activados" necesarios para diversas reacciones. La UDP-glucosa es un intermediario clave en la síntesis del glucógeno y de las glucoproteínas. La GDP-manosa, la GDP-fucosa, la UDP-galactosa y el CMP-ácido siálico son intermediarios clave de reacciones en las que las porciones azúcar son transferidas para la síntesis de glucoproteínas. El CTP se utiliza para generar CDP-colina, CDP-etanolamina y CDP-diacilgliceroles, los cuales están involucrados en el metabolismo de fosfolípidos. Otros intermediarios activados son la *S*-adenosilmetionina (SAM) y la 3′-fosfoadenosina 5′-fosfosulfato (PAPS). La *S*-adenosilmetionina es un donador de metilos en reacciones de metilación de las bases y los residuos glucídicos del RNA y el DNA, así como en la formación de compuestos como la fosfatidilcolina a partir de la fosfatidiletanolamina y carnitina a partir de lisina. La *S*-adenosilmetionina también suministra los grupos aminopropílicos necesarios para la síntesis de espermina a partir de la ornitina. El PAPS se emplea como donador de sulfatos para generar biomoléculas sulfatadas, tales como los proteoglucanos y los sulfátidos.
7. **Efectores alostéricos**: Muchos de los pasos regulados en las vías metabólicas están controlados por las concentraciones intracelulares de nucleótidos. En los capítulos anteriores se han presentado muchos ejemplos; en este capítulo, se abordará el papel de los nucleótidos en la regulación del metabolismo nucleotídico en los mamíferos.

La distribución de nucleótidos varía con el tipo celular

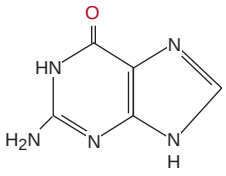
La forma principal en la que se encuentran en las células los compuestos purínicos y pirimidínicos es la de derivado 5′-nucleótido. El nucleótido que se encuentra en mayor concentración es el ATP. La distribución de los nucleótidos varía según el tipo de célula. En los eritrocitos, la concentración de los nucleótidos de adenina sobrepasa con mucho a la de los nucleótidos de guanina, citosina y uracilo. En otros tejidos, como por ejemplo el hígado, se encuentra un perfil completo de los nucleótidos y sus derivados, que incluye NAD^+, NADH, UDP-glucosa y ácido UDP-glucurónico. En las células que funcionan normalmente, predominan los nucleósidos 5′-trifosfato, mientras que en las células hipóxicas las concentraciones de nucleósidos 5′-monofosfato y nucleósido 5′-difosfato aumentan mucho. Las nucleobases libres, nucleósidos o nucleósidos 2′- y 3′-monofosfato, y bases "modificadas" constituyen productos de degradación de los nucleótidos o ácidos nucleicos endógenos o exógenos.

La concentración de **ribonucleótidos** en la célula es muy superior a la concentración de **2'-desoxirribonucleótidos**. Por ejemplo, la concentración de ATP en las células tumorales de Ehrlich es de 3600 pmol/10^6 células, mientras que la concentración de dATP es de solamente 4 pmol/10^6 células. Sin embargo, en el momento de la replicación del DNA, las concentraciones de dATP y del resto de desoxirribonucleósidos 5′-trifosfato se incrementan notablemente para satisfacer las necesidades de sustratos para la síntesis de DNA.

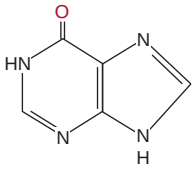
En las células normales, las concentraciones totales de nucleótidos son prácticamente constantes. Así, la concentración total de AMP más ADP más ATP es constante, pero pueden existir grandes cambios en las concentraciones individuales, de forma que el cociente ATP/(ATP + ADP + AMP) se altera en función del estado energético de la célula. Lo mismo es cierto para el NAD^+ y el NADH. La concentración total de NAD^+ más NADH está normalmente fijada entre unos límites estrechos. En consecuencia, cuando se dice que la concentración de NADH aumenta, esto implica que la concentración de NAD^+ disminuye en la proporción correspondiente en esta célula. La base de esta "concentración fija" de nucleótidos es que la síntesis *de novo* y las rutas de reciclaje de nucleótidos, nucleósidos y nucleobases están rígidamente controladas en condiciones normales.



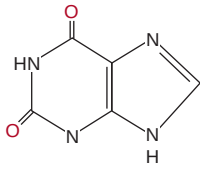
Adenina



Guanina



Hipoxantina



Xantina

FIGURA 19.1
Bases purínicas.

19.3 QUÍMICA DE LOS NUCLEÓTIDOS

Los principales derivados purínicos que se encuentran en la célula son la **adenina** y la **guanina**. Otras bases purínicas presentes son la hipoxantina y la xantina (Figura 19.1). Los derivados nucleosídicos de estas moléculas contienen ribosa o 2-desoxirribosa, unida al anillo de purina mediante un enlace ***β*-*N*-glucosídico** en N-9. Los ribonucleósidos contienen ribosa, mientras que los desoxirribonucleósidos contienen desoxirribosa en su porción azúcar (Figura 19.2). Los nucleótidos son **ésteres fosfato** de los nucleósidos purínicos (Figura 19.3). En las células pueden estar presentes 3′-nucleótidos, tales como la adenosina 3′-monofosfato (3′-AMP), pero sólo como resultado de la degradación de los ácidos nucleicos. En las células con funcionamiento normal, los tri- y difosfatos se encuentran en mayor cantidad que los monofosfatos, nucleósidos o bases libres.

Los nucleótidos pirimidínicos que se encuentran en mayores concentraciones en la célula son los que contienen **uracilo** y **citosina**. En la Figura 19.4 se representan las estructuras de estas bases. Los nucleótidos de uracilo y citosina son los componentes pirimidínicos mayoritarios del RNA. Al igual que en el caso de los derivados purínicos, los nucleósidos o nucleótidos pirimidínicos pueden contener ribosa o 2-desoxirribosa. La porción azúcar está unida a la pirimidina mediante un enlace *β*-*N*-glucosídico en el N-1. Los nucleósidos de las pirimidinas son uridina, citidina y desoxitimidina (Figura 19.5). Los ésteres fosfato de los nucleósidos pirimidínicos son UMP, CMP y dTMP. En la célula los principales derivados pirimidínicos se encuentran en forma de tri- y difosfatos (Figura 19.6).

En el apéndice (véase p. 1179) se resume la nomenclatura y la química de las bases purínicas y pirimidínicas.

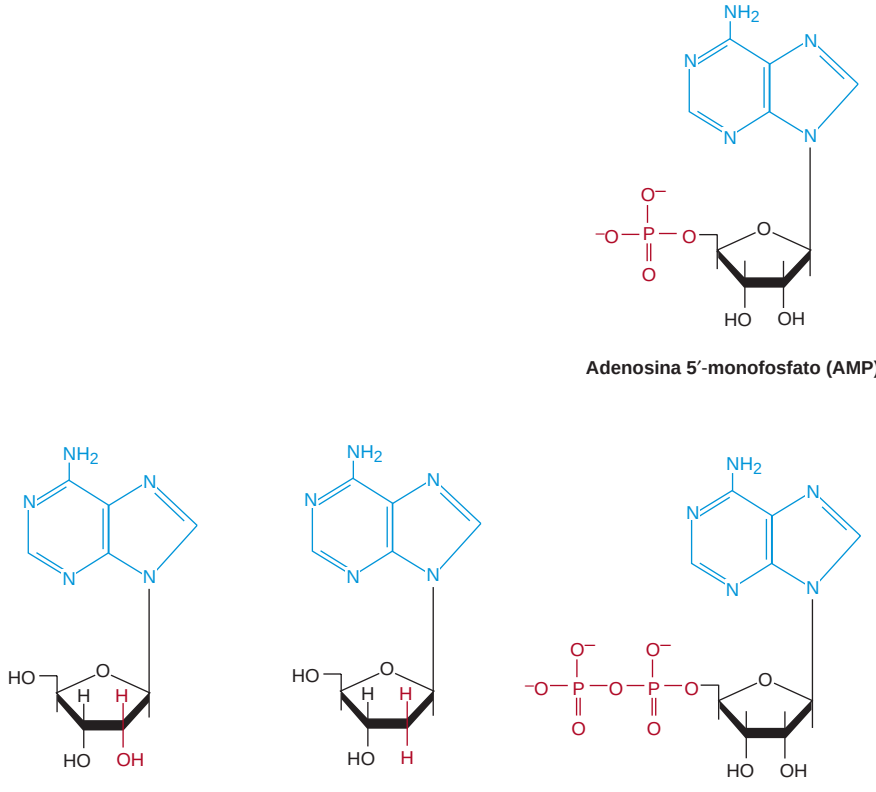
Propiedades de los nucleótidos

Los componentes celulares que contienen bases purínicas o pirimidínicas son fácilmente detectables, ya que estos compuestos absorben fuertemente la luz ultravioleta.

Adenosina

Desoxiadenosina

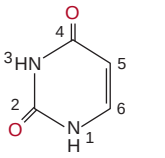
FIGURA 19.2
Adenosina y desoxiadenosina.



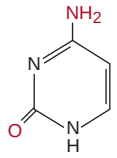
Adenosina 5′-monofosfato (AMP) | Desoxiadenosina 5′-monofosfato (dAMP)

Adenosina 5′-difosfato (ADP) | Adenosina 5′-trifosfato (ATP)

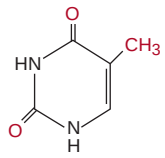
FIGURA 19.3
Nucleótidos de adenosina.



Uracil



Citosina

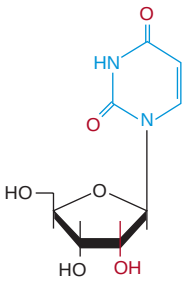


Timina

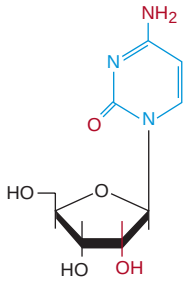
FIGURA 19.4
Bases pirimidínicas.

Las bases, nucleósidos y nucleótidos purínicos tienen absorciones más fuertes que los pirimidínicos y sus derivados. La longitud de onda a la que se produce la máxima absorción varía con cada componente básico, aunque en la mayor parte de los casos el máximo UV está cercano a los 260 nm. El espectro UV de cada uno de los derivados responde de forma diferente a los cambios de pH. Las absorciones al UV proporcionan la base de métodos sensibles para la determinación analítica de estos compuestos. Por ejemplo, la desaminación de los nucleósidos o nucleótidos de adenina a los correspondientes derivados de hipoxantina producen un notable desplazamiento del máximo de absorción desde 265 a 250 nm, fácilmente detectable. Debido a los altos coeficientes de extinción molar de las bases purínicas y pirimidínicas y a sus altas concentraciones en los ácidos nucleicos, la absorbancia a 260 nm se utiliza para cuantificar la cantidad de ácido nucleico en muestras de RNA y DNA.

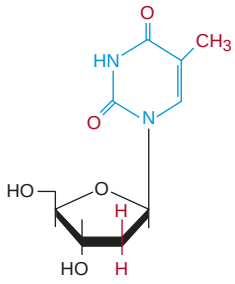
El enlace *N*-glucosídico de los nucleósidos y nucleótidos es estable en álcali. Sin embargo, la estabilidad de este enlace a la hidrólisis ácida difiere marcadamente. El enlace *N*-glucosídico de los nucleósidos y nucleótidos purínicos es fácilmente hidrolizado por ácido diluido a elevadas temperaturas (p. ej., 60 °C), produciendo así la base purínica libre y el azúcar o el azúcar-fosfato. Por otro lado, el enlace *N*-glucosídico de los nucleósidos y nucleótidos de uracilo, citosina y timina es muy estable al tratamiento ácido. Condiciones fuertes, tales como ácido perclórico (60%) y 100 °C, producen la liberación de la pirimidina libre, pero acompañada de destrucción completa de la porción azúcar. El enlace *N*-glucosídico de los nucleósidos y nucleótidos de dihidrouracilo es lábil al tratamiento ácido débil.



Uridina

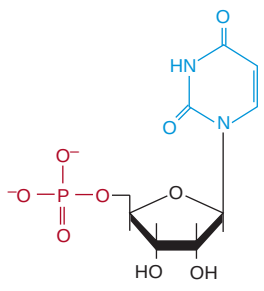


Citidina

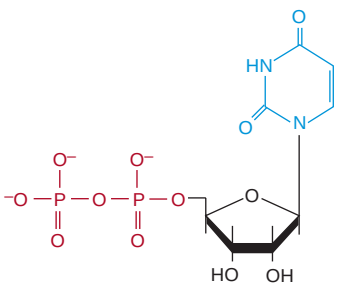


Desoxitimidina

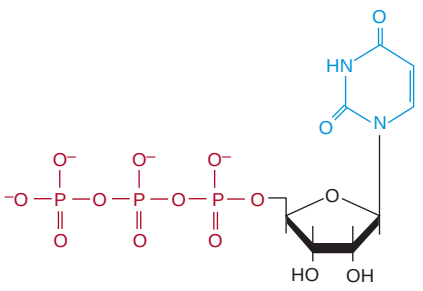
FIGURA 19.5
Nucleósidos pirimidínicos.



Uridina 5′-monofosfato (UMP)



Uridina 5′-difosfato (UDP)



Uridina 5′-trifosfato (UTP)

FIGURA 19.6
Nucleótidos del uracilo.

Debido a la alta polaridad del grupo fosfato, los nucleótidos purínicos y pirimidínicos son considerablemente más solubles en soluciones acuosas que sus nucleósidos y bases libres. En general, los nucleósidos son más solubles que las bases libres.

Las bases purínicas o pirimidínicas, así como sus derivados nucleosídicos y nucleotídicos, se pueden separar fácilmente mediante diversas técnicas. Entre estos métodos se cuentan la cromatografía en papel, cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas de celulosa o resinas de intercambio iónico, electroforesis y cromatografía en columna de intercambio iónico. Mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se separan y detectan fácilmente y de forma rápida estos compuestos en cantidades del orden del nanomol.

19.4 METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS

El anillo purínico se sintetiza *de novo* en las células de mamíferos utilizando aminoácidos como dadores de carbono y nitrógeno, y también CO_2 como dador de carbono. La **ruta de síntesis *de novo*** de los nucleótidos purínicos que conduce a la **inosina 5′-monofosfato (IMP)** consiste en diez pasos metabólicos. Varias de las reacciones de esta ruta requieren la hidrólisis del ATP para impulsar la reacción. En conjunto, la síntesis *de novo* de un nucleótido purínico es un proceso caro en términos del ATP utilizado por mol de IMP sintetizado.

Los nucleótidos purínicos se sintetizan por una construcción a pasos del anillo que conduce al IMP

Todos los enzimas implicados en la síntesis de los nucleótidos purínicos se encuentran en el citosol. No obstante, no todas las células (por ejemplo, los eritrocitos) pueden realizar la síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos. En la ruta *de novo*, una serie de reacciones conduce a la síntesis de IMP, el cual a su vez sirve como precursor tanto de la **adenosina 5′-monofosfato (AMP)** como de la **guanosina 5′-monofosfato (GMP)**. Esta ruta está altamente regulada por AMP y GMP; el IMP no es detectable en la célula en condiciones normales.

La formación del IMP se muestra en la Figura 19.7. Algunos aspectos de esta ruta deben ser destacados: el 5′-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) es sintetizado a partir de ribosa-5-fosfato generada por la vía de las pentosas fosfato; se utiliza el equivalente a 6 moles de ATP por mol de IMP sintetizado; la formación de la **5-fosforribosilamina** (el primer paso) es la etapa limitante y regulada. En la formación de la 5-fosforribosilamina, se forma el enlace N—C que será en último término el enlace *N*-glucosídico del nucleótido purínico; no se conocen pasos regulados entre la 5-fosforribosilamina y el IMP. El **tetrahidrofolato** sirve como transportador de "C_1" (N^{10}-formil H_4folato, Figura 19.8) en esta ruta. Es importante señalar que el tetrahidrofolato se regenera en las reacciones 3 y 9 (Figura 19.7). La **fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa,** que cataliza la reacción en la que se utiliza CO_2 para introducir el carbono-6 del anillo, no es una carboxilasa dependiente de biotina.

Las actividades enzimáticas que catalizan varios de los pasos de esta ruta residen en dominios separados de **proteínas multifuncionales**. Las actividades de la 5′-fosforribosilglicinamida sintetasa, 5′-fosforribosilglicinamida transformilasa y 5′-fosforribosilaminoimidazol sintetasa forman parte de una proteína trifuncional. Las actividades de la 5′-fosforribosilaminoimidazol carboxilasa y 5′- fosforribosil-4-(*N*-succinocarboxamida)-5-aminoimidazol sintetasa están en una misma proteína bifuncional. Las actividades 5′-fosforribosil-4-carboxamida-5-aminoimidazol transformilasa y la IMP ciclohidrolasa están presentes en otra proteína bifuncional.

En resumen, la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos requiere aminoácidos como dadores de carbono y nitrógeno, CO_2 como fuente de carbono y "unidades C_1" transferidas vía H_4folato. Las contribuciones de estas fuentes al anillo de purina se muestran en la Figura 19.9. Varios aminoácidos, entre ellos serina, glicina, triptófano e histidina, suministran "unidades C_1" al H_4folato (Capítulo 18), y por tanto, contribuyen a los átomos C-2 y C-8 del anillo.

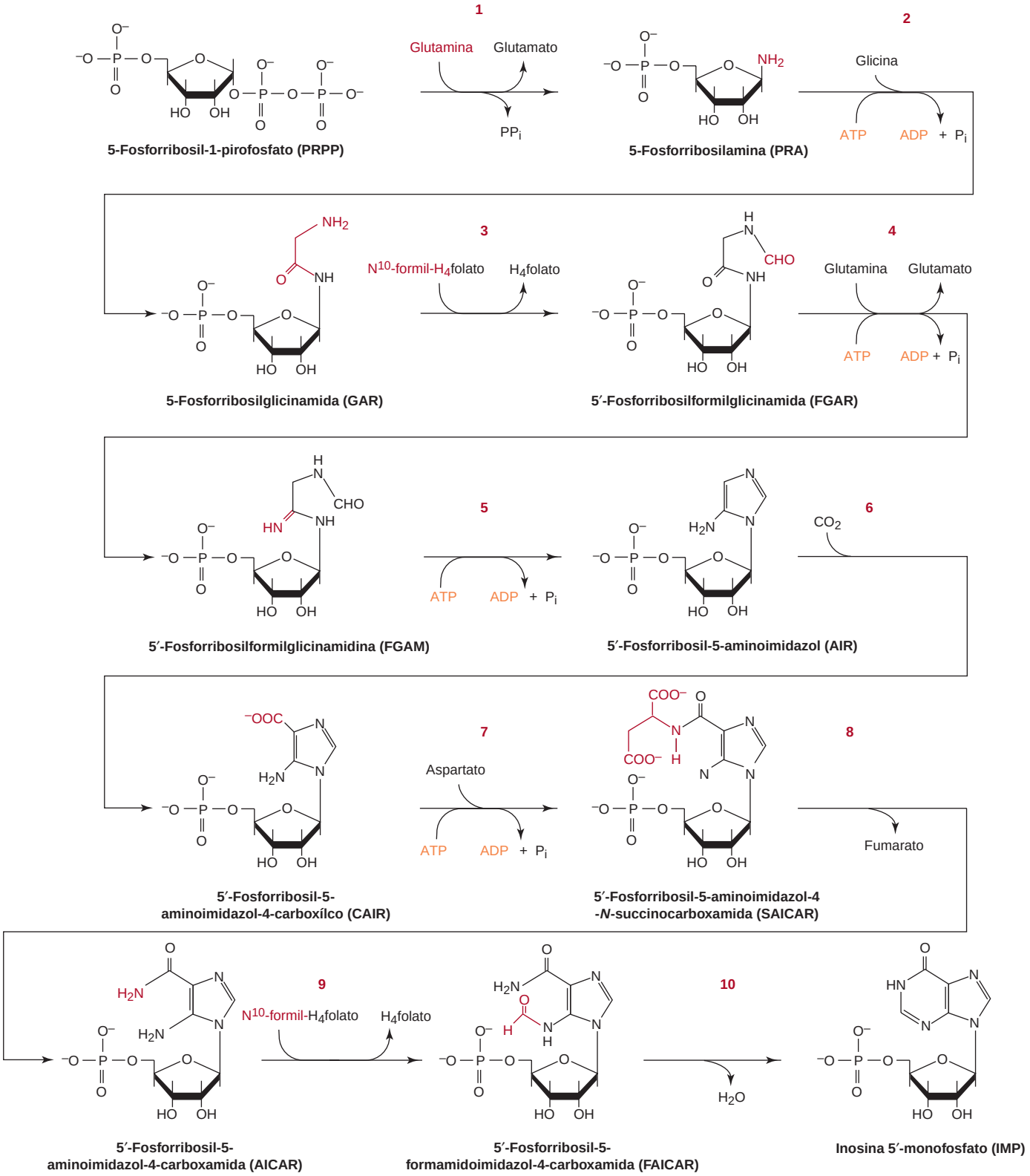


FIGURA 19.7
Síntesis *de novo* de los ribonucleótidos purínicos.
Los enzimas que catalizan las reacciones son: (1) glutamina PRPP amidotransferasa; (2) GAR sintetasa; (3) GAR transformilasa; (4) FGAM sintetasa; (5) AIR sintetasa; (6) AIR carboxilasa; (7) SAICAR sintetasa; (8) adenilosuccinato liasa; (9) AICAR tranformilasa; (10) IMP ciclohidrolasa.

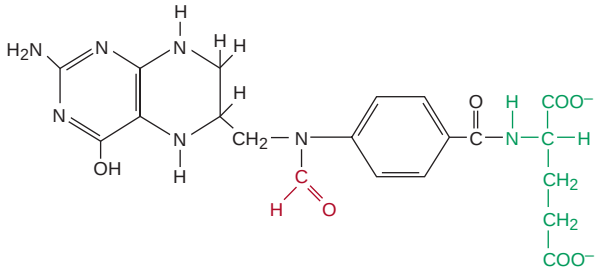


FIGURA 19.8
Estructura del N^{10}-formil H_4folato.

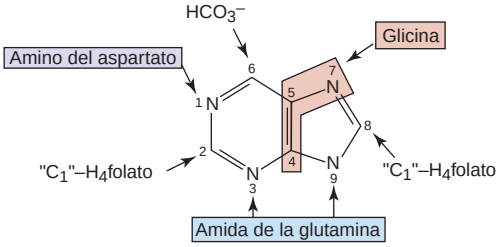


FIGURA 19.9
Origen de los átomos de carbono y nitrógeno del anillo de purina.
C-4, C-5 y N-7 de la glicina; N-3 y N-9 de la glutamina; C-2 y C-8 del "C_1"-H_4folato; N-1 del aspartato y C-6 del CO_2

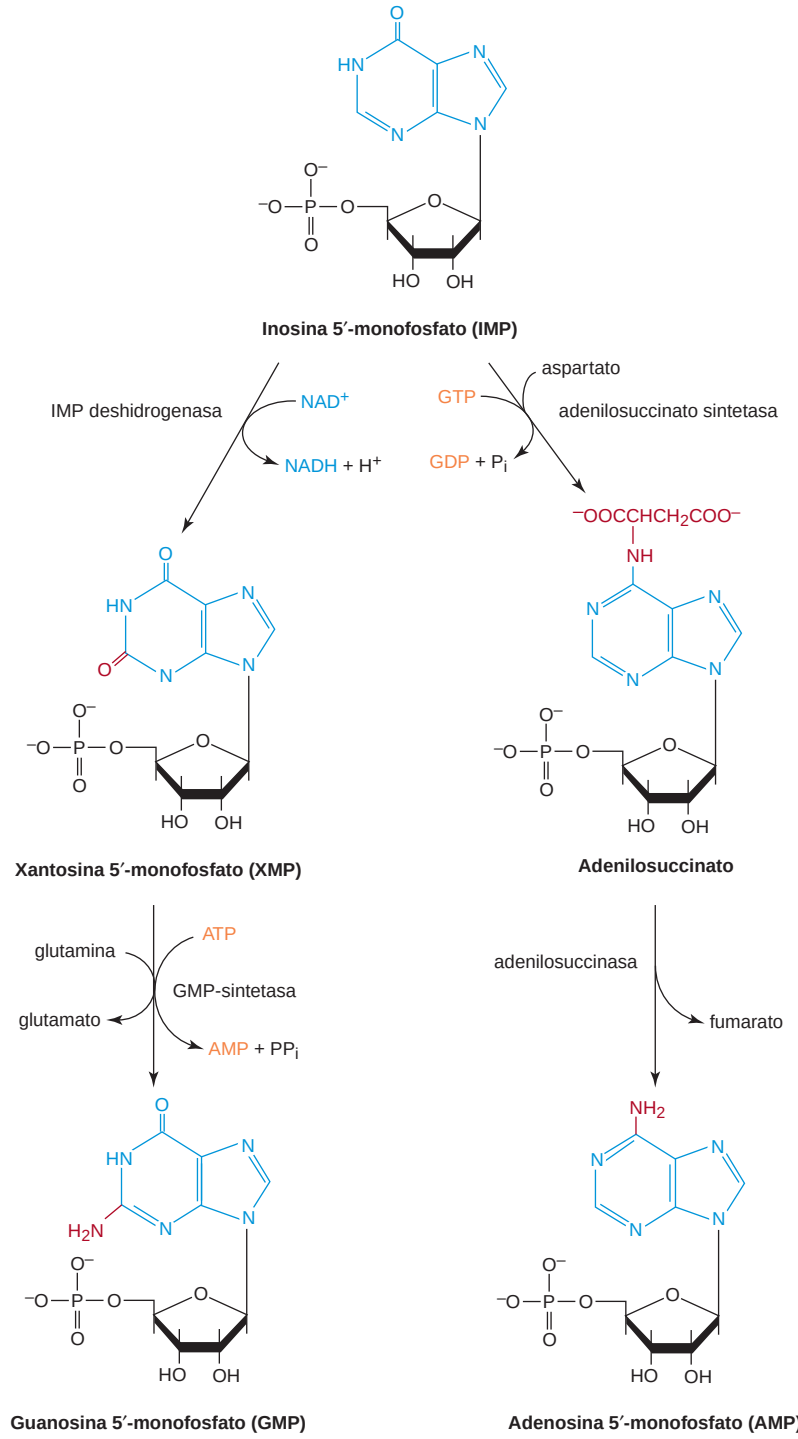


FIGURA 19.10
Formación del AMP y GMP a partir del punto de ramificación del IMP.

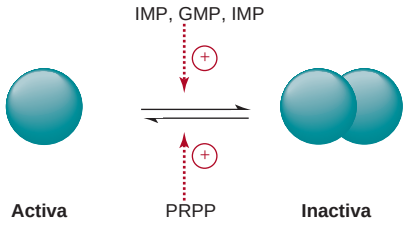


FIGURA 19.11
Efectos de los moduladores alostéricos sobre las formas moleculares de la glutamina PRPP amidotransferasa.

El IMP es el precursor común del AMP y el GMP

El IMP, el primer ribonucleótido formado en la ruta *de novo*, es el precursor común de la síntesis de AMP y GMP (Figura 19.10). El AMP y GMP son convertidos en ATP y GTP, respectivamente, utilizando **5′-monofosfato quinasas** y **nucleósido 5′-difosfato quinasas**. La conversión del IMP en AMP y GMP no tiene lugar al azar. La formación de GMP a partir de IMP requiere ATP como fuente de energía, mientras que la formación de AMP a partir del IMP requiere GTP como fuente de energía. Esto se interpreta como una relación recíproca. Es decir, cuando hay suficiente ATP en la célula, se sintetizará GMP a partir de IMP y cuando hay suficiente GTP se sintetizará AMP a partir de IMP.

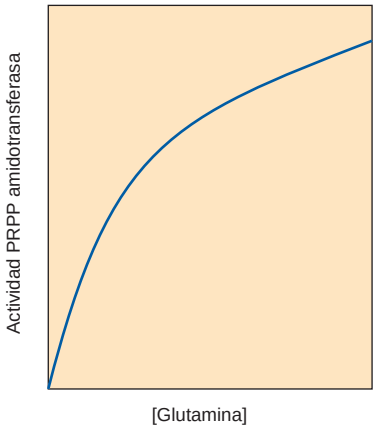
La síntesis de nucleótidos purínicos está altamente regulada

El paso comprometido de una vía metabólica es frecuentemente el punto de regulación metabólica. En la síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos la formación de la **5-fosforribosilamina** a partir de glutamina y 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), es el paso comprometido para la formación de IMP. El enzima que cataliza esta reacción, la **glutamina PRPP amidotransferasa**, es determinante de la velocidad y está regulado alostéricamente por los productos finales de la ruta, IMP, GMP y AMP. Estos nucleótidos actúan como efectores negativos. Por otra parte, el PRPP es un efector positivo. La glutamina PRPP amidotransferasa es un monómero de 135 kDa. En presencia de IMP, AMP, o GMP, el enzima forma un dímero mucho menos activo. La presencia de PRPP favorece la forma monomérica activa del enzima (Figura 19.11).

El enzima de tejidos humanos tiene centros de fijación de nucleótidos característicos. Uno de ellos fija específicamente los nucleótidos oxopurínicos (IMP y GMP), mientras que el otro fija los nucleótidos aminopurínicos (AMP). Cuando AMP y GMP o IMP están presentes de forma simultánea se produce una inhibición sinérgica del enzima. La glutamina PRPP amidotransferasa muestra una cinética hiperbólica (Figura 19.12) con respecto a la glutamina y una cinética sigmoidea con respecto al PRPP. Puesto que las concentraciones intracelulares de glutamina varían relativamente poco y son aproximadamente iguales a la K_m del enzima, la concentración de glutamina tiene un efecto pequeño en la regulación de la síntesis de IMP. Sin embargo, los niveles de PRPP en la célula varían mucho y pueden ser de 10 a 100 veces menores que la K_m para el PRPP. En consecuencia, las concentraciones de PRPP en la célula juegan un papel importante en el control de la síntesis de nucleótidos purínicos.

No se conocen pasos regulados entre la formación de la 5-fosforribosilamina y el IMP. Sin embargo, existe regulación en el punto de ramificación del IMP a GMP y del IMP a AMP. De IMP a GMP, la **IMP deshidrogenasa** es el enzima limitante de velocidad y es regulado por el GMP, que actúa como un inhibidor competitivo. La **adenilosuccinato sintetasa**, es el enzima limitante de velocidad para la conversión de IMP en AMP, actuando este último como inhibidor competitivo.

Deben existir además otros mecanismos que regulen el cociente ATP/GTP dentro de unos límites relativamente estrechos. En la mayoría de las células, la concentración celular total de nucleótidos de adenina (ATP más ADP más AMP) es de cuatro a seis veces la de nucleótidos de guanina (GTP más GDP más GMP). En la Figura 19.13 se resume la regulación global de la síntesis de los nucleótidos purínicos. Existen defectos en la ruta metabólica que conducen a la pérdida de regulación de la síntesis de nucleótidos purínicos y dan lugar a la sobreproducción de nu-



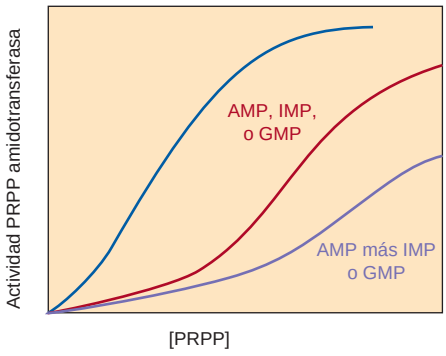


FIGURA 19.12
Actividad glutamina PRPP-amidotransferasa en función de las concentraciones de glutamina o de PRPP.

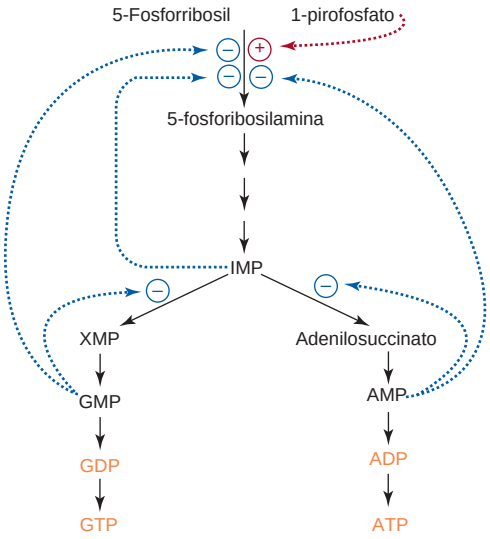


FIGURA 19.13
Regulación de la síntesis de nucleótidos purínicos.

cleótidos purínicos y del producto final, el ácido úrico. Esto se traduce en un cuadro clínico relativamente común, conocido como gota (véase Apli. Clín. 19.1).

Las bases y nucleósidos purínicos se recuperan para volver a formar nucleótidos

La eficiencia del metabolismo normal se manifiesta mediante la presencia de dos "**rutas de recuperación**" diferentes. Una de las vías utiliza las bases, hipoxantina, guanina y adenina como sustratos, mientras que la otra utiliza nucleósidos previamente formados como sustratos. En cada ruta exite especificidad respecto a la base o nucleósido que se "recupera". La "recuperación" de las bases necesita la actividad de **fosforribosiltransferasas** que utilicen PRPP como dador de ribosa fosfato. Existen dos fosforribosiltransferasas diferentes. La **hipoxantina–guanina fosforribosiltransferasa (HGPRTasa)** cataliza las reacciones:

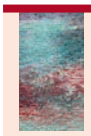
$$\text{Hipoxantina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{IMP} + \text{PP}_i$$

y

$$\text{Guanina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{GMP} + \text{PP}_i$$

y la **adenina fosforribosiltransferasa (APRTasa)** cataliza:

$$\text{Adenina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$$



APLICACIÓN CLÍNICA 19.1
Gota

La gota se caracteriza por niveles elevados de ácido úrico en la sangre y orina debidos a varias anormalidades metabólicas que conducen a la sobreproducción de nucleótidos purínicos por la ruta *de novo*. Muchos, si no todos, de los síntomas clínicos asociados con los niveles elevados de ácido úrico aparecen como resultado de la baja solubilidad del ácido úrico en medios acuosos. El depósito de cristales de urato sódico en las articulaciones de las extremidades y en el tejido intersticial renal desencadena las secuelas. La hiperuricemia debida a la sobreproducción de ácido úrico a través de la ruta *de novo* puede distinguirse de la hiperuricemia que es consecuencia de enfermedad renal o muerte celular excesiva (como por ejemplo, aumento en la degradación de ácidos nucleicos por la radioterapia). El suministro de [^{15}N] glicina a un paciente que sea sobreproductor tendrá como resultado que el ácido úrico secretado en la orina esté enriquecido en ^{15}N en el N-7 del ácido úrico, mientras que en un paciente no sobreproductor no habrá enriquecimiento en ^{15}N en el ácido úrico.

Los estudios sobre pacientes afectados de "gota" han puesto de manifiesto que los defectos que causan la sobreproducción de ácido úrico son múltiples y heterogéneos. En algunos casos, los defectos bioquímicos no se han podido definir. Los siguientes son ejemplos de defectos bioquímicos que causan un aumento en la síntesis de nucleótidos purínicos:

1. Aumento de la actividad PRPP sintetasa: El aumento de esta actividad conduce al incremento en los niveles intracelulares de PRPP. Tal como se ha explicado en la sección correspondiente a la regulación de la síntesis de nucleótidos purínicos, el PRPP actúa como un efector positivo de la glutamina–PRPP amidotransferasa, lo que conduce a un incremento en el flujo a través de la ruta *de novo*, al estar marcadamente incrementada la actividad del paso limitante de velocidad.
2. Actividad parcial de la HGPRTasa: Una disminución parcial de la actividad HGPRTasa tiene dos consecuencias con respecto a la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos. En primer lugar, al haber una disminución en la recuperación de hipoxantina y guanina, el PRPP no es consumido por la reacción de la HGPRTasa y puede activar la glutamina–PRPP amidotransferasa. En segundo lugar, al disminuir la recuperación de hipoxantina y guanina, no se forman IMP y GMP a través de esta vía, de manera que la regulación de la etapa de la PRPP amidotransferasa por el IMP y GMP como efectores negativos se ve comprometida.
3. Deficiencia de glucosa 6-fosfatasa: En pacientes que presentan deficiencia de glucosa 6-fosfatasa (enfermedad de von Gierke, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I) se da también frecuentemente hiperuricemia y gota. La pérdida de actividad glucosa 6-fosfatasa tiene como consecuencia que una mayor cantidad de glucosa 6-fosfato se desvíe hacia la ruta de las pentosas fosfato. Como resultado de la mayor actividad de la desviación de las pentosas fosfato, se genera más ribosa 5-fosfato y se incrementa el nivel de PRPP intracelular. El PRPP es un efector positivo de la PRPP amidotransferasa.

Estos ejemplos muestran que los factores que incrementan la etapa limitante de velocidad en la síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos conducen a un incremento en la síntesis y degradación a ácido úrico. Existen diferentes maneras de abordar el tratamiento de la gota, que incluyen la colchicina, los fármacos antihiperuricémicos y el alopurinol. El alopurinol y su metabolito, la aloxantina, son inhibidores eficientes de la xantina oxidasa y causan una disminución en los niveles de ácido úrico. En pacientes sobreproductores que no tienen una deficiencia grave de la actividad HGPRTasa, el tratamiento con alopurinol inhibe la xantina oxidasa, y aumenta por tanto la concentración de hipoxantina y xantina. Estas bases purínicas son entonces recuperadas para formar IMP y XMP. Estas reacciones consumen PRPP y generan nucleótidos purínicos que son inhibidores de la PRPP amidotransferasa. El efecto global es que el tratamiento con alopurinol disminuye tanto la formación de ácido úrico como la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos.

Becker, M.A. y Roessler, B.J. Hyperuricemia and Gout in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver, C.R., Beaudet, A. L. Sly, W. S. y Valle, D (Eds.) Vol II, Chapter 49, 1655, 1995.

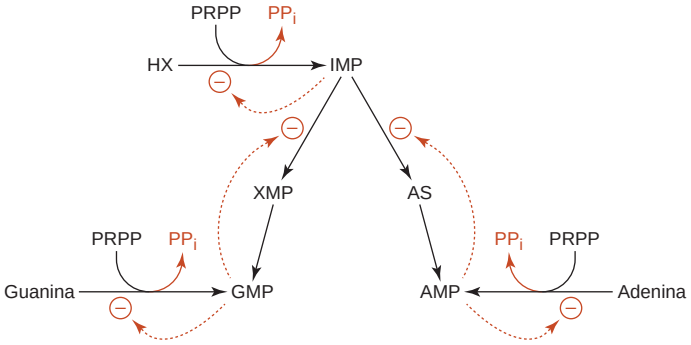


FIGURA 19.14
Recuperación de nucleobases purínicas vía fosforribosiltransferasas.
Efecto de los productos sobre la síntesis de AMP y GMP a partir de IMP. Las líneas a trazos representan los pasos de regulación; ⊖ inhibición.

Estos dos enzimas no se solapan en cuanto a la especificidad de sustrato. Las reacciones están reguladas por los productos finales. El IMP y el GMP son inhibidores competitivos, con respecto al PRPP, en la reacción de la HGPRTasa. Por su parte, el AMP es un inhibidor competitivo, con respecto al PRPP, de la APRTasa. De esta forma, queda regulada la recuperación de bases purínicas.

La hipoxantina y la guanina para el reciclaje provienen de la degradación de nucleótidos purínicos endógenos o exógenos. La adenina utilizada en la reacción de la APRTasa parece provenir fundamentalmente de la síntesis de poliaminas (veáse p. 807). Por cada molécula de **espermina** sintetizada, se forman dos moléculas de **5′-metiltioadenosina** que se degrada a **5′-metiltiorribosa-1-fosfato** y adenina en una reacción catalizada por la **5′-metiltioadenosina fosforilasa**. La adenina se recicla mediante la reacción de la APRTasa.

La producción de GMP y AMP a través de estas reacciones catalizadas por fosforribosiltransferasas inhibe eficazmente la vía *de novo* en el paso de la PRPP amidotransferasa. En primer lugar, se consume el PRPP, lo que hace disminuir la velocidad de formación de 5-fosforribosilamina; en segundo lugar, el AMP y el GMP son retroinhibidores de este paso (véase Figura 19.14).

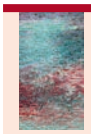
La actividad HGPRTasa está disminuida de forma importante en el **síndrome de Lesch–Nyhan** (Apli. Clín. 19.2), que se caracteriza clínicamente por hiperuricemia, retraso mental y automutilación.

Nucleósidos tales como la adenosina se "recuperan" mediante la adenosina quinasa, una 5′-fosfotransferasa que utiliza ATP como dador de fosfato. La especificidad de sustrato de las 5′-fosfotransferasas varía con la nucleósido quinasa concreta.

En conjunto, estas reacciones de recuperación conservan energía y permiten que las células formen nucleótidos a partir de las bases libres. El eritrocito, por ejemplo, no contienen glutamina PRPP amidotransferasa y, por tanto, no puede sintetizar 5-fosforribosilamina, el primer metabolito exclusivo de la síntesis de nucleótidos purínicos. En consecuencia, el hematíe ha de depender de las purina fosforribosiltransferasas y 5′-fosfotransferasa (adenosina quinasa) para rellenar sus reservas de nucleótidos.

Los nucleótidos purínicos se interconvierten para mantener un equilibrio adecuado entre los nucleótidos de adenina y guanina

La síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos se encuentra bajo un finísimo control, ejercido en el paso comprometido catalizado por la **glutamina PRPP amidotransferasa** y en el punto de ramificación de IMP a AMP y de IMP a GMP. En las células de mamíferos hay otros enzimas que permiten la interconversión de nucleótidos de adenina y guanina para mantener el equilibrio apropiado entre las concentraciones celulares de estos nucleótidos purínicos. Estas interconversiones tienen lugar mediante pasos indirectos. No existe una ruta directa en un solo paso para la conversión del GMP en AMP o del AMP en GMP. En ambos casos, el AMP o el GMP se metaboliza a IMP (Figura 19.15). Estas reacciones están catalizadas por enzimas diferentes, cada uno de los cuales está sometido a controles separados. La desaminación reductora del GMP a IMP está catalizada por la **GMP reductasa**. Este paso está activado por el GTP, mien-



APLICACIÓN CLÍNICA 19.2
Síndrome de Lesch–Nyhan

El síndrome de Lesch–Nyhan se caracteriza clínicamente por hiperuricemia, producción excesiva de ácido úrico y problemas neurológicos, entre los que pueden encontrarse la parálisis, retraso mental y automutilación. Esta enfermedad está asociada a una deficiencia grave o completa de actividad HGPRTasa. El gen de la HGPRTasa se halla en el cromosoma Y, por lo que la deficiencia prácticamente sólo aparece en varones. En un estudio sobre los pacientes disponibles se observó que si la actividad HGPRTasa era inferior a un 2% de la normal, aparecía retraso mental, y que si la actividad era inferior al 0,2% de la normal, entonces aparecía el síntoma de la automutilación. Esta deficiencia conduce también a la excreción de hipoxantina y xantina.

Existen más de un centenar de mutaciones que afectan al gen de la HGPRTasa que han sido caracterizadas en pacientes de la enfermedad de Lesch–Nyhan. Estas mutaciones conducen a la pérdida de la proteína HGPRTasa, la pérdida de la actividad HGPRTasa, "mutantes K_m", proteína HGPRTasa con una vida media corta, etc.

El papel de la HGPRTasa es catalizar reacciones en que la hipoxantina y la guanina se convierten en nucleótidos. La hiperuricemia y la producción excesiva de ácido úrico que tienen lugar en los pacientes con el síndrome de Lesch–Nyhan se explican fácilmente por la falta de actividad HGPRTasa. La hipoxantina y la guanina no se recuperan, lo que conduce al incremento de las reservas intracelulares de PRPP y a la diminución de los niveles de IMP o GMP. Ambos factores promueven la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos, sin tener en consideración la regulación adecuada de esta ruta en la reacción de la PRPP amidotransferasa.

Aún no se comprende por qué un defecto grave en esta ruta de recuperación conduce a problemas neurológicos. La actividad adenina foforribosiltransferasa en estos pacientes es normal o elevada. Con este enzima de reciclaje, probablemente las necesidades celulares de nucleótidos purínicos podrían ser cubiertas por la conversión de AMP a GMP vía IMP si la ruta *de novo* de la célula no estuviera funcionando. La distribución normal en los tejidos de la actividad HGPRTasa puede explicar quizás los síntomas neurológicos. El cerebro (lóbulo frontal, ganglios basales y cerebelo) posee 10 a 20 veces la actividad que se encuentra en hígado, bazo, o riñón, y de 4 a 8 veces la presente en eritrocitos. Individuos afectados por gota primaria, con formación excesiva de ácido úrico e hiperuricemia, no muestran problemas neurológicos. Sobre esta base, se argumenta que los productos de degradación de las purinas (hipoxantina, xantina y ácido úrico) no pueden ser tóxicos para el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, es posible que estos metabolitos sean tóxicos para el SNC en desarrollo, o que la falta de este enzima conduzca a un desequilibrio en las concentraciones de nucleótidos purínicos en momentos críticos del desarrollo.

Si la actividad IMP deshidrogenasa en el cerebro fuera extremadamente baja, la falta de HGPRTasa podría provocar un descenso en los niveles intracelulares de GTP, debido a una disminución en la recuperación de guanina. Como el GTP es un precursor de la tetrahidrobiopterina, un cofactor necesario para la biosíntesis de neurotransmisores, y se precisa para otras funciones como la transducción de señales vía proteínas G y para la síntesis de proteínas, niveles bajos de GTP durante el desarrollo podrían ser el factor que desencadena las manifestaciones neurológicas observadas.

El tratamiento de los pacientes de Lesch–Nyhan con alopurinol disminuye la cantidad de ácido úrico formado, aliviando así algunos de los problemas causados por los depósitos de urato sódico. Sin embargo, debido a que el paciente de Lesch–Nyhan sufre una marcada reducción de la actividad HGPRTasa, la hipoxantina y la guanina no son recuperadas, no se consume PRPP, y en consecuencia la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos no se detiene. No existe tratamiento para los problemas neurológicos. Estos pacientes mueren normalmente por insuficiencia renal debido a los elevados depósitos de urato sódico.

Rossiter, B. J. F. y Caskey, C. T. Hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase deficiency: Lesch–Nyhan syndrome and gout. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed., Vol. II, Chap. 50. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 1679; y Nyhan, W. L. The recognition of Lesch–Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20:171,1997.

tras que la xantina monofosfato (XMP) es un potente inhibidor competitivo de la reacción. El GTP, aunque no es requerido por el enzima, aumenta su actividad al disminuir la K_m del enzima con respecto al GMP y aumentar la $V_{máx}$.

La **AMP desaminasa** (**5′-AMP aminohidrolasa**) cataliza la desaminación del AMP a IMP y es activada por el K^+ y el ATP, e inhibida por el P_i, GDP y GTP. En ausencia de iones K^+, la curva de la velocidad frente a la concentración de AMP es sigmoidea. La presencia de iones K^+ no es necesaria para la actividad máxima, pero actúa como efector alostérico positivo reduciendo la K_m aparente hacia el AMP.

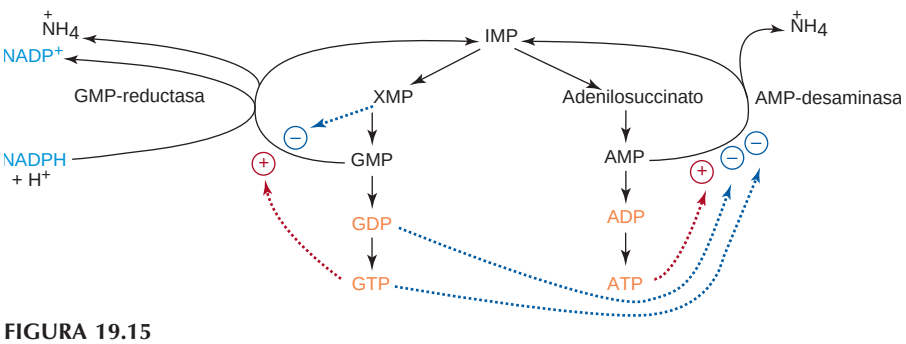


FIGURA 19.15
Interconversión de los nucleótidos purínicos.

El efecto neto de estas reacciones es que las células pueden interconvertir nucleótidos de adenina y guanina para satisfacer sus necesidades, al tiempo que mantienen el control sobre estas reacciones.

El GTP es precursor de la tetrahidrobiopterina

El GTP es el precursor directo para la síntesis de **tetrahidrobiopterina** (Figura 19.16). Las reacciones de conversión del GTP en tetrahidrobiopterina están catalizadas por la **GTP ciclohidrolasa I**, **6-piruvil-tetrahidropterina sintasa** y **sepiapterina reductasa**; la GTP ciclohidrolasa I es la limitante de la velocidad. Muchos tipos celulares sintetizan tetrahidrobiopterina. La tetrahidrobiopterina es un cofactor necesario para las reacciones de hidroxilación que involucran la fenilalanina, tirosina y triptófano (véase p. 797) y está implicada en la generación de óxido nítrico. Los inhibidores de la IMP deshidrogenasa causan una marcada reducción en los niveles celulares de tetrahidrobiopterina, lo que demuestra la importancia del GTP como precursor de la tetrahidrobiopterina y de la IMP deshidrogenasa como enzima limitante de la velocidad de formación del GTP.

La degradación de purinas en el ser humano conduce a ácido úrico como producto final

La degradación de los nucleótidos, nucleósidos y bases purínicas converge en una ruta común que conduce a la formación de ácido úrico (Figura 19.17). Los enzi-

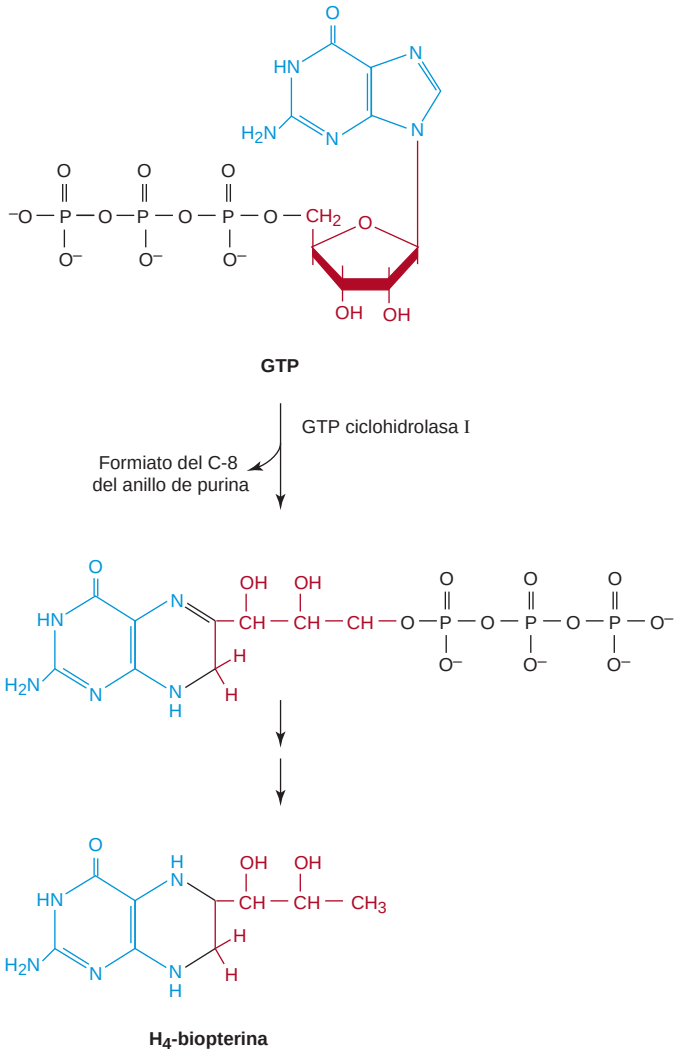


FIGURA 19.16
Síntesis de la tetrahidrobiopterina a partir de GTP.

mas implicados en la degradación de los ácidos nucleicos y de los nucleótidos y nucleósidos tienen una especificidad variable. Las **nucleasas** presentan especificidad hacia el RNA o el DNA, y también respecto de las bases y posición de ruptura de los enlaces 3′,5′-fosfodiéster. Hay **nucleotidasas** con una especificidad relativamente elevada, como por ejemplo la 5′-AMP nucleotidasa, junto con otras de especificidad amplia, tales como las fosfatasas ácidas y alcalinas, que hidrolizan cualquiera de los nucleótidos 3′ ó 5′ (véase Apli. Clín. 19.3). La AMP desaminasa es específica para el AMP. La **adenosina desaminasa** es menos específica, ya que este enzima desamina no solamente la adenosina, sino también la 2′-desoxiadenosina y muchos otros nucleósidos 6-aminopurínicos.

La **nucleósido purínico fosforilasa** cataliza las reacciones reversibles:

$$\text{Inosina} + P_i \leftrightarrow \text{hipoxantina} + \text{ribosa 1-P}$$

o

$$\text{Guanosina} + P_i \leftrightarrow \text{guanina} + \text{ribosa 1-P}$$

o

$$\text{Xantosina} + P_i \leftrightarrow \text{xantina} + \text{ribosa 1-P}$$

La desoxiinosina y la desoxiguanosina son también sustratos naturales de la nucleósido purínico fosforilasa. Esto es importante ya que la eliminación de desoxiguanosina evita la acumulación incontrolada de dGTP, que en elevadas concentraciones es tóxico para las células. Aunque las constantes de equilibrio de las reacciones

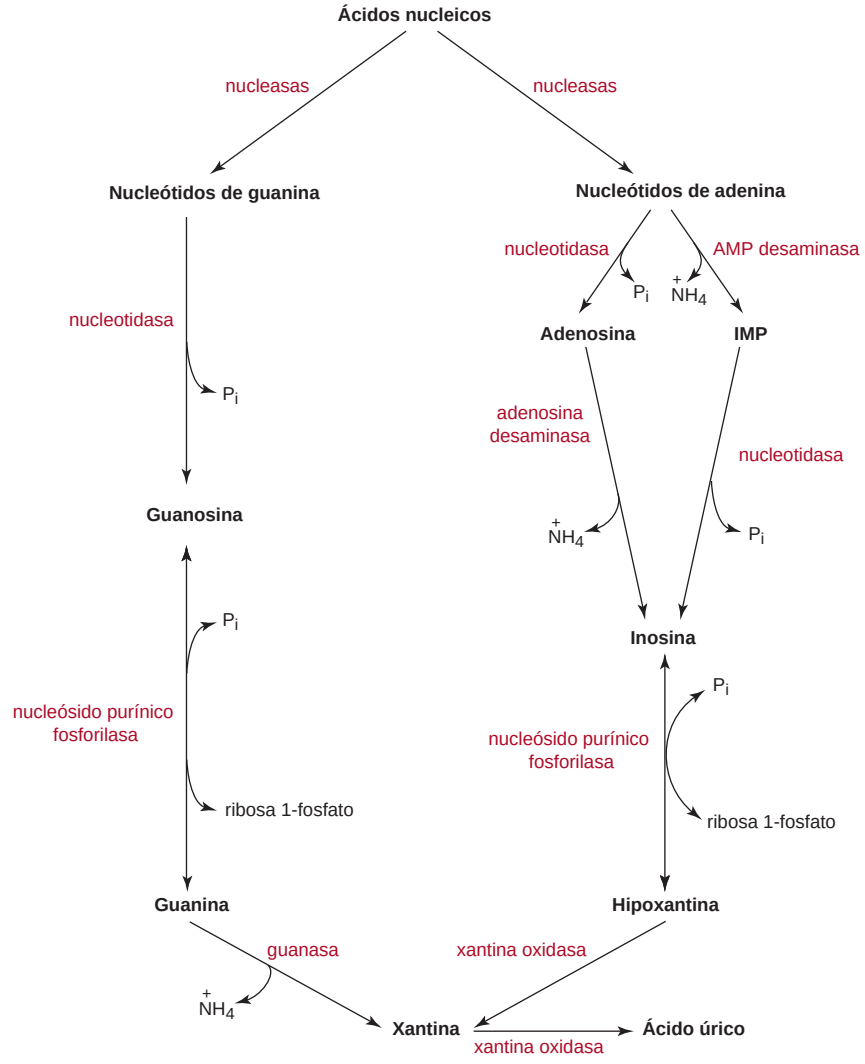
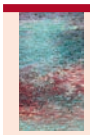


FIGURA 19.17
Degradación de los nucleótidos purínicos.



APLICACIÓN CLÍNICA 19.3
Actividad 5′-nucleotidasa citosólica incrementada

Un informe reciente describía cuatro pacientes en los que la actividad 5′-nucleotidasa en lisados de fibroblastos, utilizando 5′-AMP o 5′-UMP como sustratos, estaba incrementada de seis a diez veces en estos pacientes en comparación con los controles. Estos cuatro niños sin relación entre sí tenían problemas con "retraso en el desarrollo, ataques, ataxia, infecciones, déficit severo de lenguaje, y un fenotipo de comportamiento inusual caracterizado por hiperactividad, períodos de atención cortos e interacción social deficiente". Dado que era posible que la actividad 5′-nucleotidasa celular aumentada estuviese reduciendo las reservas de nucleótidos, se trataron los pacientes con uridina por vía oral. De modo notable, los pacientes tratados con uridina mejoraron espectacularmente en todos los aspectos de comportamiento físico y médico. Estos hallazgos apuntan de nuevo al hecho que la sobreproducción o bloqueo de la síntesis de nucleótidos, y la degradación aumentada o disminuida de nucleótidos o nucleósidos puede tener consecuencias importantes en el bienestar del individuo.

Page, T., Yu, A., Fontanesi, J. y Nyhan, W. L. Developmental disorder associated with increased cellular nucleotidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11601, 1997.

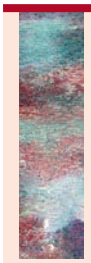
catalizadas por la nucleósido purínico fosforilasa favorecen la dirección de la síntesis de nucleósidos, en las células las concentraciones de bases purínicas y ribosa-1-fosfato libres son demasiado bajas para apoyar la síntesis de nucleósidos en condiciones normales. La principal función del enzima es la vía de degradación más que la de síntesis. La deficiencia de adenosina desaminasa está asociada con una **inmunodeficiencia combinada grave**, mientras que la deficiencia de nucleósido purínico fosforilasa está asociada con una **inmunidad de células T** defectuosa y una inmunidad normal de células B (Apli. Clín. 19.4).

APLICACIÓN CLÍNICA 19.4
Enfermedades inmunodeficientes asociadas con defectos en el metabolismo de los nucleósidos purínicos

Dos enfermedades inmunodeficientes diferentes están asociadas con defectos en la adenosina desaminasa (ADA) y nucleósido purínico fosforilasa (PNP), respectivamente. Estos enzimas están implicados en las rutas de degradación que conducen a la formación de ácido úrico. Los sustratos naturales de la adenosina desaminasa son la adenosina y desoxiadenosina, mientras que los sustratos naturales de la nucleósido purínico fosforilasa son la inosina, guanosina, desoxiinosina y desoxiguanosina. La deficiencia de ADA está asociada con una inmunodeficiencia combinada grave que afecta a la función tanto de las células T como de las células B. La deficiencia de PNP está asociada con una inmunodeficiencia que afecta a la función de las células T pero no a la de las células B. En ninguno de los dos casos se conoce exactamente el mecanismo por el que la falta de estos enzimas interfiere con la función inmune. No obstante, en pacientes con deficiencia de ADA, se produce un gran incremento en las concentraciones intracelulares de dATP y de S-adenosilhomocisteína. Se han propuesto varias hipótesis para explicar las consecuencias bioquímicas de la falta de ADA: (1) los niveles altos de dATP inhiben la actividad de la ribonucleótido reductasa y en consecuencia inhiben la síntesis de DNA; (2) la desoxiadenosina inactiva la S-adenosilhomocisteína hidrolasa, provocando la disminución de la S-adenosilmetionina necesaria para la metilación de las bases en el RNA y DNA; y (3) la concentración elevada de adenosina tiene como resultado el incremento de los niveles de cAMP. Es posible que cada uno de dichos mecanismos contribuya al efecto global de la disfunción inmune. No hay, sin embargo, una explicación adecuada para la especificidad de los efectos sobre solamente las células T y B.

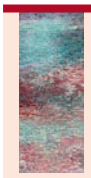
El tratamiento de niños con deficiencia de ADA ha incluido transfusiones sanguíneas, trasplante de médula ósea, terapia de reemplazamiento del enzima con un conjugado de ADA–polietilenglicol (ADA–PEG) y, más recientemente, terapia génica. Cada uno de estos tratamientos tiene inconvenientes. Las transfusiones sanguíneas producen problemas de "sobrecarga de hierro" y seguridad de la fuente. Los trasplantes de médula ósea, aunque son curativos, precisan de un donante compatible adecuado. La terapia de reemplazamiento del enzima con ADA–PEG ha sido la de más éxito hasta ahora, pero el tratamiento requiere el control constante de los niveles de ADA y frecuentes inyecciones de ADA–PEG, lo que supone un costo considerable. La terapia génica representa la esperanza para el futuro. Hay fuertes indicaciones de que en los primeros ensayos de terapia génica el gen de la ADA ha sido transfectado con éxito en células madre de niños con deficiencia de ADA.

Hershfield, M. S. y Mitchell, B. S. Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed., Vol. II, Chap. 52, New York McGraw-Hill, 1995, p. 1725; Hoogerbrugge, P. M., von Beusechem, V. W., Kaptein, L. C., Einerhard, M. P. y Valerio, D. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Br. Med. Bull.* 51:72, 1995; Hershfield, M. S. Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy. *Semin. Hematol.* 35:291, 1998; Russell, C. S. y Clarke, L. A. Recombinant proteins for genetic disease. *Clin. Genet.* 55:389, 1999; Onodera, M., Nelson, D. M., Sakiyama, Y., Candotti, F. y Blaese, R. M. Gene therapy for severe combined immunodeficiency caused by adenosine deaminase deficiency: improved retroviral vectors for clinical trials. *Acta Haematol.* 101:89, 1999; y Carpenter, P. A., Ziegler, J. B. y Vowels, M. R. Late diagnosis and correction of purine nucleoside phosphorylase deficiency with allogenic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 17:121, 1996.



APLICACIÓN CLÍNICA 19.5
Pacientes de cáncer sometidos a tratamiento radio o quimioterapéutico

Los pacientes de cáncer con grandes tumores que están sometidos a tratamientos radio o quimioterapéuticos muestran también mayores concentraciones de ácido úrico en el suero y en la orina. La fuente de este exceso de ácido úrico no se debe a un incremento de la síntesis de nucleótidos purínicos sino más bien a la destrucción de las células tumorales que a su vez liberan ácidos nucleicos degradados y nucleótidos celulares que se continuan metabolizando hasta ácido úrico. Muchos de los protocolos para el tratamiento del cáncer incluyen entre los fármacos el alopurinol con el único fin de limitar la acumulación de ácido úrico en los pacientes.



APLICACIÓN CLÍNICA 19.6
Subclase de pacientes con autismo

Recientemente se demostró que una subclase de niños con autismo infantil excretaba una cantidad de ácido úrico superior a dos desviaciones estándar sobre la media normal. Este grupo de niños representa aproximadamente el 20% de la población autista. Se encontró, utilizando cultivos de fibroblastos de estos niños autistas, que la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos, medida según la incorporación de [^{14}C]formiato en nucleótidos purínicos estaba incrementada cuatro veces sobre la vista en el control de fibroblastos normales. Por el momento no se conoce la base molecular del incremento de la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos en estos niños autistas. Un aspecto inusual de este incremento en la síntesis de nucleótidos purínicos en estos niños es que la excreción de ácido úrico está elevada pero la concentración de ácido úrico en suero se encuentra en la zona normal.

Page, T. y Coleman, M. Purine metabolism abnormalities in a hyperuricosuric subclass of autism. *Biochim. Biophys. Acta* 1500:291, 2000.

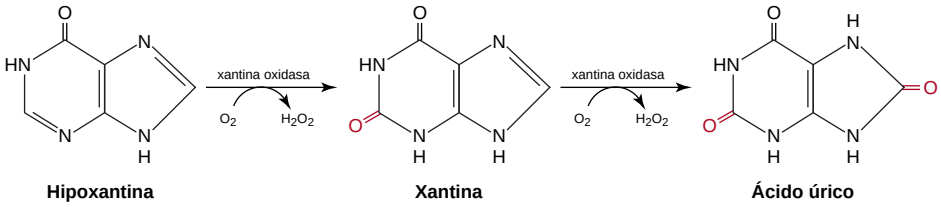


FIGURA 19.18
Reacciones catalizadas por la xantina oxidasa.

Formación de ácido úrico

Como se muestra en la Figura 19.17, los nucleótidos de adenina conducen a hipoxantina, mientras que los nucleótidos de guanina son metabolizados a xantina. Estas purinas son metabolizadas por la **xantina oxidasa** para formar **ácido úrico**, producto final único de la degradación de nucleótidos purínicos en el cuerpo humano. Las reacciones se muestran en la Figura 19.18.

La xantina oxidasa es un enzima que contiene FAD, Fe y Mo y requiere oxígeno molecular como sustrato. Como el ácido úrico no es muy soluble en medio acuoso, hay trastornos clínicos en los que una elevación del nivel de ácido úrico conduce al depósito de cristales de urato sódico, principalmete en las articulaciones. La hiperuricemia es una condición clínica caracterizada por niveles en exceso de ácid úrico en la sangre y, generalmente, niveles incrementados de excreción de ácido úrico por la orina (hiperuricuria). Dado que el ácido úrico es el único producto final de la degradación de purinas en el cuerpo humano, los niveles excesivos de ácido úrico indican alguna situación metabólica que puede ser más o menos grave. Hay varios casos en los que se puede definir la causa de la hiperuricemia/hiperuricuria como una alteración metabólica y otras situaciones en las que no hay una alteración metabólica definida (véanse Aplis. Clín. 19.1, 19.2, 19.5 y 19.6).

19.5 METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PIRIMIDÍNICOS

En las células de los mamíferos, el anillo pirimidínico se sintetiza *de novo* utilizando aminoácidos, como dadores de carbono y nitrógeno, y CO_2, como dador de carbono. La síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos conduce a la **uridina 5′-monofosfato** (UMP) en seis pasos metabólicos. Es necesaria la hidrólisis de ATP (o equivalente) para impulsar diversos pasos de la ruta.

Los nucleótidos pirimidínicos se sintetizan mediante una secuencia de reacciones que conduce al UMP

En contraste con la síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos, no todos los enzimas de la síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos se encuentran en el citosol celular. Las reacciones que conducen a la formación del UMP se muestran en la Figura 19.19. Deben destacarse los siguientes aspectos importantes de la ruta. El anillo de pirimidina se forma primero y a continuación se añade la ribosa 5-fosfato vía PRPP. El enzima que cataliza la formación de carbamil fosfato, la **carbamil fosfato sintetasa II** es citosólico, y diferente de la **carbamil fosfato sintetasa I** mitocondrial involucrada en el ciclo de la urea. La síntesis de *N*-carbamil aspartato es la etapa comprometida en la síntesis de nucleótidos pirimidínicos, pero la formación de carbamil fosfato citosólico es el paso regulado. La formación de **orotato** a partir del dihidroorotato está catalizada por **la dihidroorotato deshidrogenasa** mitocondrial. Los otros enzimas de la ruta se encuentran en el citosol en proteínas multifuncionales. Las actividades de la carbamil fosfato sintetasa II, **aspartato carbamil transferasa** y **dihidroorotasa** están presentes en una proteína trifuncional (CAD), y las actividades **orotato fosforribosiltransferasa** y **OMP-descarboxilasa** se encuentran en una proteína bifuncional, definida como UMP sintasa. Un defecto en esta proteína bifuncional, que afecta bien a la actividad fosforribosiltransferasa, bien a la actividad descarboxilasa, conduce a una raro trastorno clínico conocido como

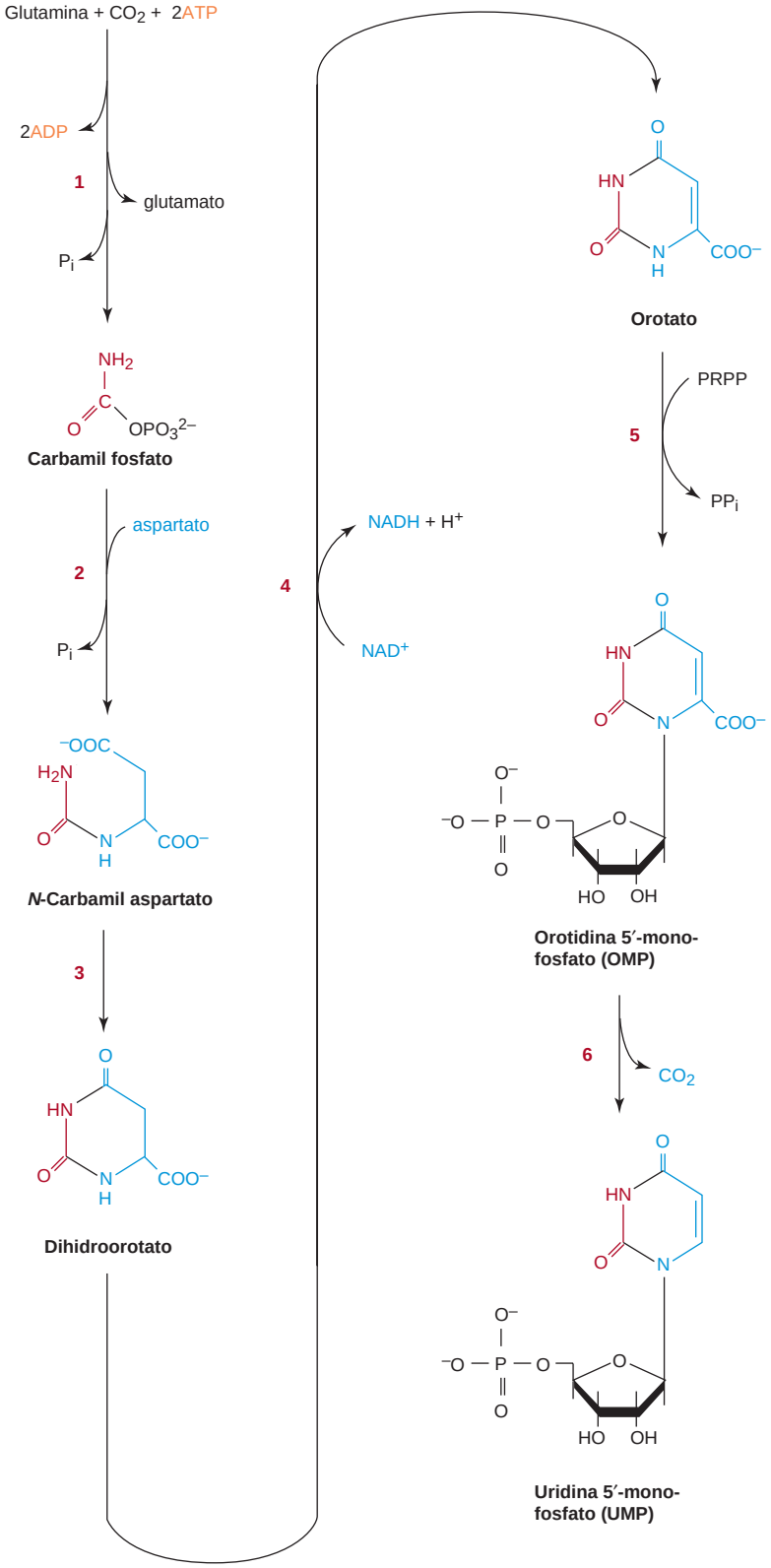
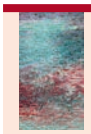


FIGURA 19.19
Síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos. Las actividades enzimáticas que catalizan las reacciones son: (1) carbamil fosfato sintetasa II, (2) aspartato carbamil-transferasa, (3) dihidroorotasa, (4) dihidroorotato deshidrogenasa, (5) orotato fosforribosiltransferasa y (6) OMP descarboxilasa. Las actividades de 1, 2, y 3 residen en una proteína trifuncional (CAD); las actividades de 5 y 6 residen en una proteína bifuncional (UMP sintasa).

aciduria orótica hereditaria (véase Apli. Clín. 19.7). Estudios recientes han demostrado que un fármaco inmunosupresor, la leflunomida, que se utiliza en el tratamiento de la artritis dermatoide, inhibe la síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos específicamente a nivel de la dihidroorotato deshidrogenasa, el enzima de localización mitocondrial de la síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos.



APLICACIÓN CLÍNICA 19.7
Aciduria orótica hereditaria

La aciduria orótica hereditaria es consecuencia de un defecto en la síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos. Esta enfermedad genética se caracteriza por una fuerte anemia, retraso en el crecimiento y elevados niveles de excreción de ácido orótico. La base bioquímica de esta aciduria orótica es un defecto en una o las dos actividades (orotato fosforribosiltransferasa y orotidina descarboxilasa) asociadas con la proteína bifuncional UMP sintasa. Aunque esta enfermedad es muy rara, el conocimiento de la base metabólica de la misma ha permitido un tratamiento eficaz. Se suministra a estos pacientes uridina, lo que produce no sólo la reversión del problema hematológico, sino que también disminuye la formación de ácido orótico. La uridina es captada por las células y convertida por la uridina fosfotransferasa en UMP, que es convertido secuencialmente en UDP y a continuación UTP. El UTP formado a partir de la uridina exógena, a su vez, inhibe la carbamil fosfato sintetasa II, el principal enzima regulador de la ruta *de novo*. Como resultado, la síntesis del ácido orótico procedente de la vía *de novo* disminuye marcadamente, a niveles prácticamente normales. Dado que el UTP es también un sustrato para la síntesis de CTP el tratamiento con uridina sirve para rellenar las reservas celulares de UTP y CTP. De hecho, pues, la uridina exógena esquiva la UMP sintasa defectiva y proporciona a las células el UTP y CTP necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y otras funciones celulares. El éxito del tratamiento de la aciduria orótica hereditaria con uridina proporciona información *in vivo* sobre la importancia de la etapa catalizada por la carbamil fosfato sintetasa II como sitio de regulación de la síntesis de nucleótidos pirimidínicos en el ser humano.

Webster, D. R., Becroft, D. M. O. y Suttle, D. P. Hereditary orotic aciduria and other disorders of pyrimidine metabolism. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed., Vol. II, Chap. 55. New York: McGraw-Hill, 1995, 1799; Suchi, M., Mizuno, H., Kawai, Y., Tonboi, T., et al. Molecular cloning of the human UMP synthase gene and characterization of a point mutation in two hereditary orotic aciduria families. *Am. J. Hum. Genet.* 60:525, 1997.

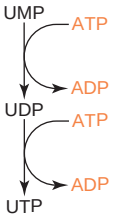


FIGURA 19.20
Formación del UTP a partir del UMP.

El UMP se convierte en UTP por la acción de **nucleótido quinasas** (Figura 19.20). La **CTP sintetasa** cataliza la formación de CTP a partir de UTP, siendo la glutamina el donador del grupo amino (Figura 19.21). La CTP sintetasa muestra una cinética sigmoidea homotrópica; el CTP, el producto, es un efector negativo de la reacción, tal como se muestra en la Figura 19.22. Al regular de esta manera la CTP sintetasa, las células mantienen una proporción adecuada de UTP y CTP para las funciones celulares y para la síntesis de RNA.

En resumen, la síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos requiere aspartato y glutamina como fuentes de carbono y nitrógeno y CO_2 como donador de carbono (Figura 19.23). Cinco de las seis reacciones de la ruta tienen lugar en el citosol celular, mientras que la restante se produce en las mitocondrias. Las actividades enzimáticas citosólicas residen en proteínas multifuncionales. El UTP es el precursor directo del CTP.

La síntesis de nucleótidos pirimidínicos está regulada a nivel de la carbamil fosfato sintetasa II

La regulación de la síntesis de nucleótidos pirimidínicos en las células de mamíferos tiene lugar en el paso de la carbamil fosfato sintetasa II. La carbamil fosfato sintetasa II es un enzima citosólico, diferente de la carbamil fosfato sintetasa I que uti-

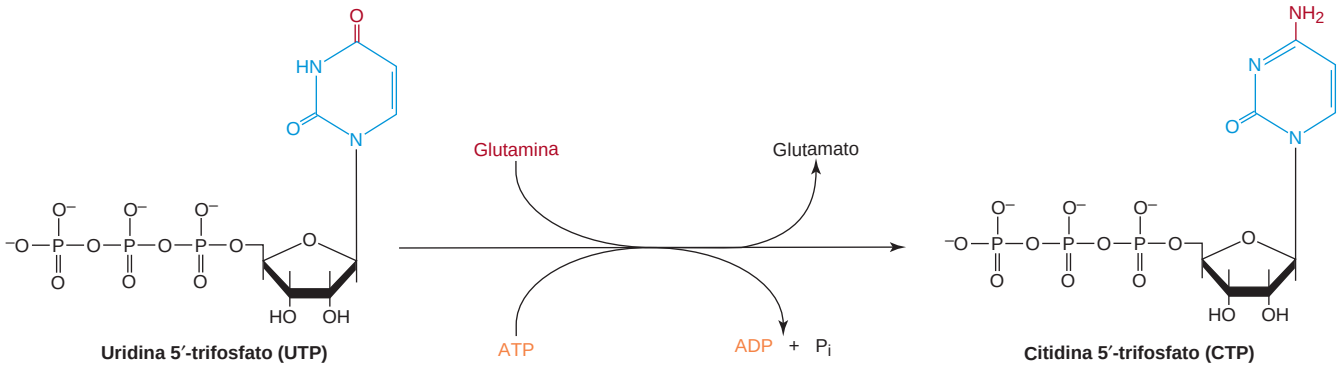


FIGURA 19.21
Formación del CTP a partir del UTP.

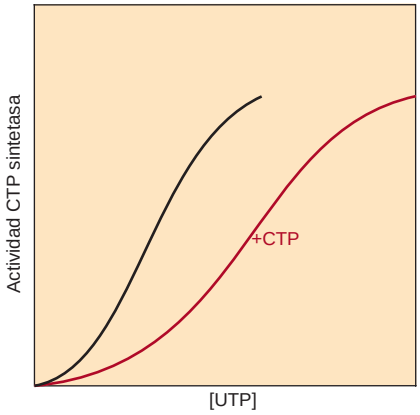


FIGURA 19.22
Regulación de la CTP sintetasa.

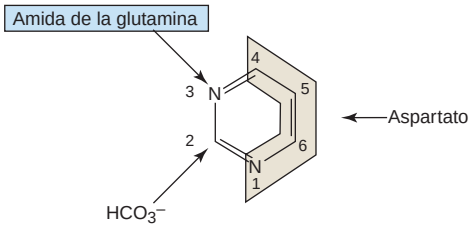


FIGURA 19.23
Origen de los átomos de carbono y nitrógeno en las pirimidinas.
C-4, C-5, C-6 y N-3 del aspartato; N-1 de la glutamina; y C-2 del CO_2.

liza amoníaco como dador de nitrógeno, y es activada por el *N*-acetilglutamato. La carbamil fosfato sintetasa II es inhibida por el UTP, un producto final de la vía, y activada por el PRPP. La K_i para el UTP y la K_a para el PRPP están en la gama de valores que permiten a los niveles intracelulares de UTP y PRPP tener efecto sobre el control de la síntesis de nucleótidos de pirimidina. La carbamil fosfato sintetasa II es la única fuente de carbamil fosfato en los tejidos extrahepáticos. No obstante, en el hígado, en condiciones fisiológicas de estrés, en las que se da un exceso de amoníaco, la carbamil fosfato sintetasa I genera carbamil fosfato en la mitocondria, que pasa al citosol, y sirve como sustrato para la síntesis de nucleótidos pirimidínicos. Esta ruta sirve para la destoxificación del exceso de amoníaco. Como resultado de la toxicidad del amoníaco en el ser humano, se excretan altas concentraciones de ácido orótico. Esto apunta a que la carbamil fosfato sintetasa II es la principal actividad regulada en el metabolismo de los nucleótidos pirimidínicos.

El UMP no inhibe la carbamil fosfato sintetasa II, pero sí que compite con el OMP, inhibiendo la **OMP-descarboxilasa** (Figura 19.24). Tal como se ha indicado previamente, la conversión de UTP en CTP se encuentra también regulada, de forma que las células puedan mantener un equilibrio entre nucleótidos de uridina y citidina.

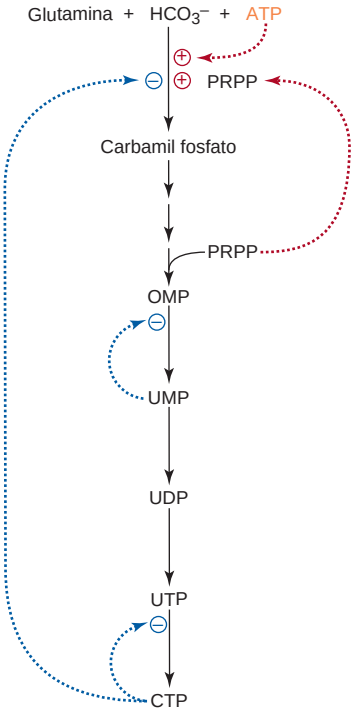


FIGURA 19.24
Regulación de la síntesis de nucleótidos pirimidínicos.
Las flechas continuas representan reacciones catalizadas enzimáticamente y las líneas de trazos representan inhibición por productos de las reacciones.

Las bases pirimidínicas se recuperan para volver a formar nucleótidos

Las pirimidinas se pueden "recuperar" por conversión en nucleótidos, mediante la **pirimidina fosforribosiltransferasa**. La reacción general es:

$$\text{Pirimidina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{pirimidina nucleósido 5}'\text{-monofosfato} + PP_i$$

El enzima de eritrocitos humanos puede utilizar orotato, uracilo y timina como sustratos, pero no citosina. Estas rutas de reciclaje desvían las bases pirimidínicas de la ruta degradativa al nivel de nucleótido. A medida que las bases pirimidínicas se vuelven asequibles a la célula, existen reacciones en competencia que resultarán bien en la degradación y excreción, bien en la reutilización de las bases. Por ejemplo, el uracilo se degrada rápidamente a β-alanina en el hígado normal, mientras que células tumorales en proliferación convierten el uracilo en UMP. Esto es consecuencia de la asequibilidad de PRPP, de los niveles enzimáticos y del estado metabólico de las células.

19.6 FORMACIÓN DE DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS

Tal como se indicó anteriormente, las concentraciones de **desoxirribonucleótidos** son muy bajas en las células que no se encuentran en estado de proliferación. Sólo en el momento de la replicación del DNA (fase S) aumenta la reserva de desoxirribonucleótidos, con el fin de permitir la necesaria síntesis de DNA.

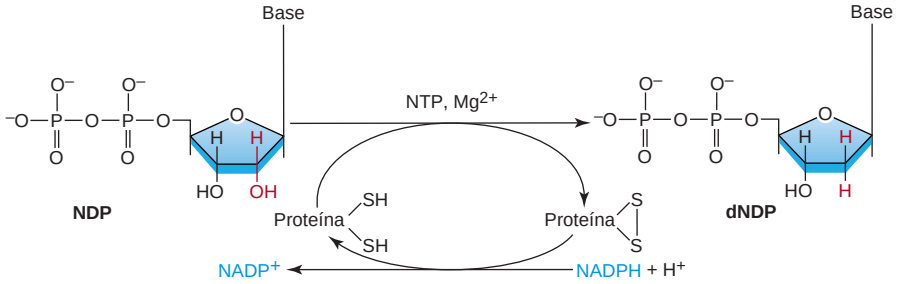


FIGURA 19.25
Síntesis *de novo* de 2′-desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos.

Los desoxirribonucleótidos se forman por reducción de los ribonucleósidos difosfato

La **nucleósido 5′-difosfato reductasa (ribonucleótido reductasa)** cataliza la conversión de los ribonucleósidos 5′-difosfato en 2′-desoxirribonucleótidos. La reacción está controlada por la cantidad de enzima presente en las células y por un mecanismo de control alostérico finamente regulado. La reacción se resume en la Figura 19.25. La reducción de un sustrato determinado requiere la presencia de un nucleósido 5′-trifosfato específico como efector positivo. Por ejemplo, la reducción de CDP o UDP requiere ATP como efector positivo, mientras que la reducción de ADP y GDP requiere la presencia de dGTP y dTTP, respectivamente (Tabla 19.1). Una proteína de baja masa molecular, la **tiorredoxina** o **glutarredoxina**, está implicada en la reducción en la posición 2′ a través de la oxidación de sus grupos sulfhidrilo. Para completar el ciclo catalítico, se utiliza NADPH para regenerar los grupos sulfhidrilo libres en la proteína. La flavoproteína **tiorredoxina reductasa** es necesaria si está implicada la tiorredoxina; si la proteína es la glutarredoxina, están implicados el glutatión y la **glutatión reductasa**.

El enzima ribonucleótido reductasa de mamíferos consiste en dos subunidades no idénticas (heterodímero), ninguna de las cuales tiene actividad por sí sola. La subunidad mayor contiene por lo menos dos centros diferentes de fijación de efectores, mientras que la subunidad pequeña contiene un hierro no hemo y un radical libre tirosilo estable. Las dos subunidades forman al unirse el centro activo del enzima. Ambas están codificadas por genes separados, en cromosomas diferentes. Los mRNA para estas subunidades, y en consecuencia las proteínas, se expresan de forma diferencial durante el ciclo celular.

La actividad de la ribonucleótido reductasa está bajo control alostérico. Mientras que la reducción de cada sustrato requiere la presencia de un efector positivo específico, los productos sirven como potentes efectores negativos del enzima. En la Tabla 19.1 se resumen los efectos de los nucleósidos 5′-trifosfatos como reguladores de la actividad ribonucleótido reductasa. El desoxiATP es un potente inhibidor de la reducción de los cuatro sustratos: CDP, UDP, GDP y ADP; el dGTP inhibe la reducción de CDP, UDP y GDP; el dTTP inhibe la reducción de CDP, UDP y ADP. Así el dGTP y el dTTP pueden servir de efectores tanto positivos como negativos de la ribonucleótido reductasa. Esto significa que mientras que el dGTP es el activador positivo requerido para la reducción del ADP, también sirve como inhibidor efectivo de la reducción de CDP y UDP; el dTTP es el efector positivo de la reducción del GDP

TABLA 19.1 Nucleósido 5′-trifosfatos como reguladores de la actividad ribonucleótido reductasa

Sustrato	*Efector positivo principal*	*Efector negativo principal*
CDP	ATP	dATP, dGTP, dTTP[a]
UDP	ATP	dATP, dGTP, dTTP[a]
ADP	dGTP	dATP
GDP	dTTP	dATP

[a]En orden decreciente de actividad.

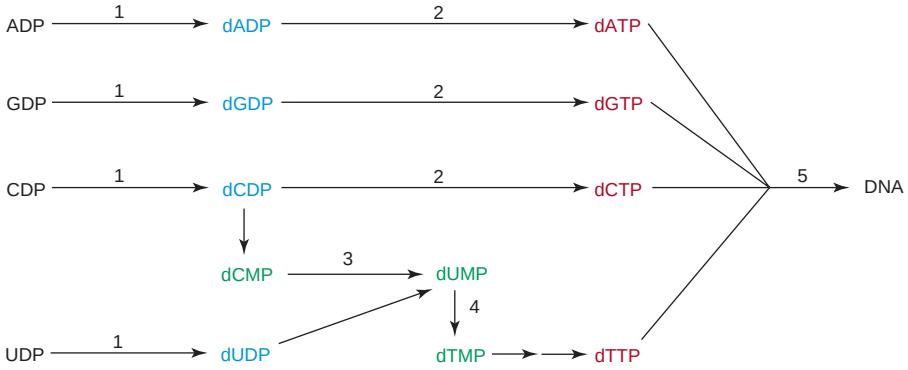


FIGURA 19.26
Papel de la ribonucleótido reductasa en la síntesis de DNA.
Los enzimas que catalizan las reacciones son: (1) ribonucleótido reductasa, (2) nucleósido 5′-difosfato quinasa, (3) desoxicitidilato desaminasa, (4) timidilato sintasa y (5) DNA polimerasa.

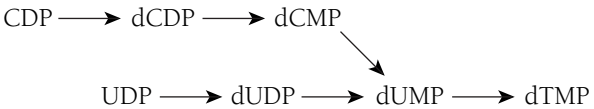
y sirve como inhibidor para el CDP y el UDP. La inhibición efectiva de la ribonucleótido reductasa por el dATP, dGTP o dTTP explica la toxicidad de la desoxiadenosina, desoxiguanosina y desoxitimidina en diversas células de mamíferos.

La ribonucleótido reductasa es la única responsable de la catálisis de las reacciones limitantes de velocidad en las que se generan *de novo* los 2′-desoxirribonucleósidos 5′-trifosfato para la replicación del DNA, tal como se resume en la Figura 19.26. Los inhibidores de la ribonucleótido reductasa son potentes inhibidores de la síntesis de DNA y, por tanto, de la replicación celular.

La síntesis de desoxitimidilato requiere N^5,N^{10}-metileno H_4folato

El **desoxitimidilato** (dTMP) se forma a partir del 2′-desoxiuridina 5′-monofosfato (dUMP) en una reacción singular. La **timidilato sintasa** cataliza la transferencia de una unidad monocarbonada desde el N^5,N^{10}-metileno H_4folato (Figura 19.27) al dUMP y simultáneamente se reduce a un grupo metilo. La reacción se presenta en la Figura 19.28. En esta reacción, el N^5,N^{10}-metileno H_4folato actúa tanto como agente de transferencia de C_1, como agente reductor. Esta es la única reacción en que el H_4folato, actuando como transportador de C_1, es oxidado a H_2folato. No se conocen mecanismos de regulación para esta reacción.

El sustrato para esta reacción puede provenir de dos rutas diferentes, tal como se muestra a continuación:



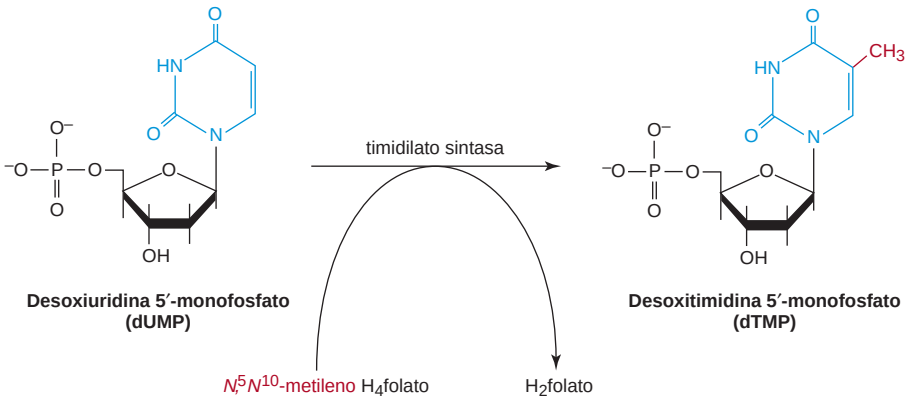


FIGURA 19.28
Síntesis del nucleótido de desoxitimidina.

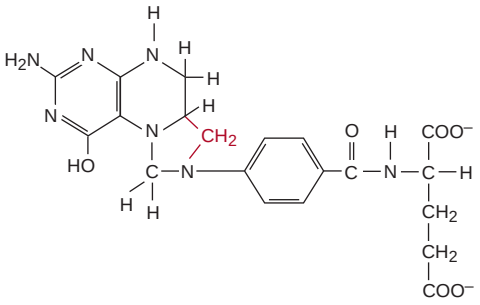


FIGURA 19.27
Estructura del N^5,N^{10}-metileno H_4folato.

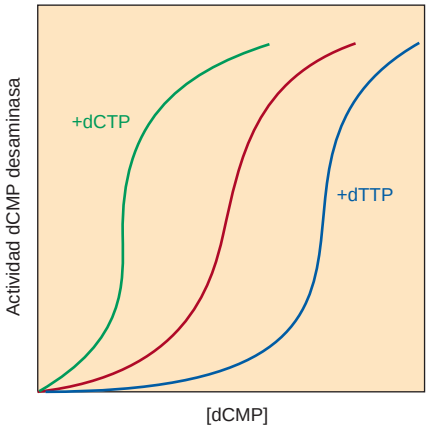


FIGURA 19.29
Regulación de la dCMP desaminasa.

En ambas rutas, los desoxirribonucleótidos, dCDP o dUDP, son generados en reacciones catalizdas por la ribonucleótido reductasa. En una vía, el dUMP se genera a partir de dUDP, mientras que en la otra vía, el dCMP se desamina a dUMP. En base a estudios de marcaje parece que la ruta principal de formación de dUMP implica la desaminación del dCMP por la **dCMP desaminasa**, enzima que está sujeto a regulación alostérica por el dCTP (positiva) y por el dTTP (negativa) (Figura 19.29). Esta regulación de la dCMP desaminasa por el dCTP y por el dTTP permite que las células mantengan el equilibrio correcto de dCTP y dTTP para la síntesis de DNA.

Interconversiones pirimidínicas, con especial énfasis en los nucleósidos y nucleótidos desoxirribopirimidínicos

Tal como se expuso en la Sección 19.4, existen rutas metabólicas para las interconversiones de los nucleótidos purínicos, rutas que están reguladas para mantener un equilibrio apropiado entre los nucleótidos de adenina y guanina. Existen también rutas para la interconversión de los nucleótidos pirimidínicos y estas rutas son de especial importancia para los desoxirribonucleósidos y desoxirribonucleótidos pirimidínicos, tal como se resume en la Figura 19.30. Obsérvese que el dCTP y el dTTP son los principales efectores positivos y negativos en las interconversiones y la recuperación de los desoxirribonucleósidos.

Los nucleótidos pirimidínicos se degradan a β-aminoácidos

El recambio de los ácidos nucleicos da lugar a la liberación de nucleótidos de pirimidina y purina. La degradación de los nucleótidos pirimidínicos sigue la ruta que se muestra en la Figura 19.31. Los nucleótidos pirimidínicos se convierten en nucleósidos por acción de fosfatasas inespecíficas. La citidina y la desoxicitidina son desaminadas a uridina y desoxiuridina por la **nucleósido pirimidínico desaminasa**. La **uridina fosforilasa** cataliza la fosforólisis de la uridina, desoxiuridina y timidina, a uracilo y timina.

El uracilo y la timina continúan degradándose mediante reacciones análogas, aunque los productos finales son diferentes, tal como se muestra en la Figura 19.32. El uracilo se degrada a β-alanina, NH_4^+ y CO_2. Ninguno de estos productos es exclusivo de la degradación del uracilo, por lo que no puede estimarse el recambio de los nucleótidos de citosina y de uracilo a partir de los productos finales de esta vía. La degradación de la timina conduce a **ácido β-aminoisobutírico**, NH_4^+ y

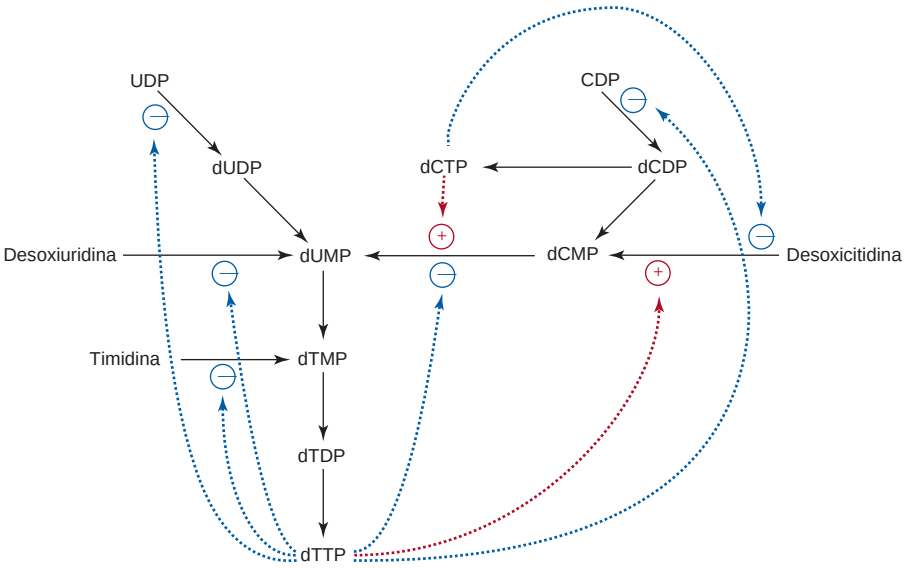


FIGURA 19.30
Interconversiones de nucleótidos pirimidínicos, con énfasis en el metabolismo de los desoxirribonucleótidos.
Las flechas continuas representan reacciones catalizadas enzimáticamente. Las líneas de trazos representan lugares de control.

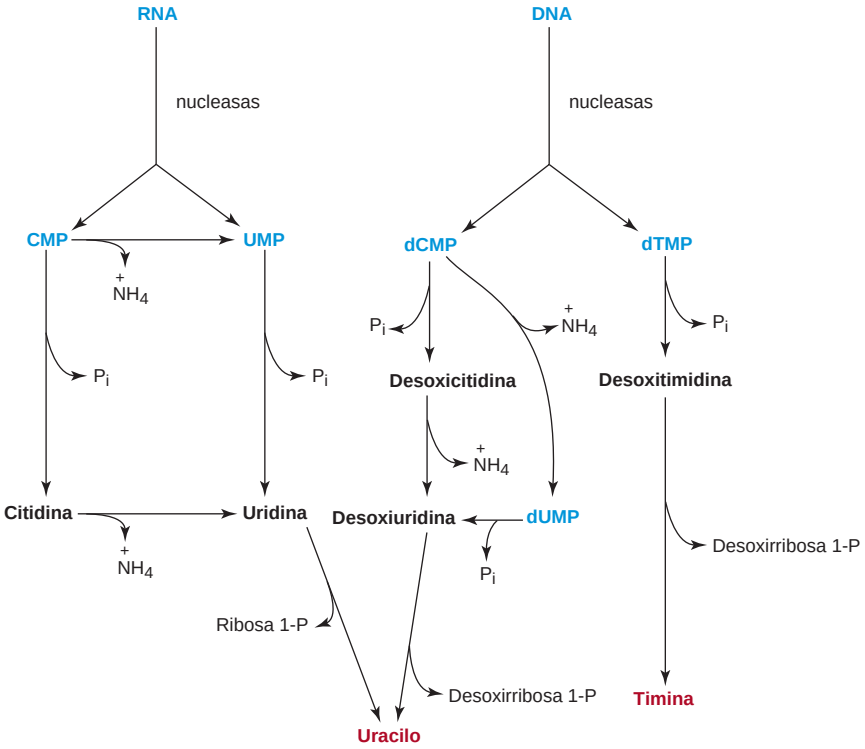


FIGURA 19.31
Rutas de degradación de los nucleótidos pirimidínicos.

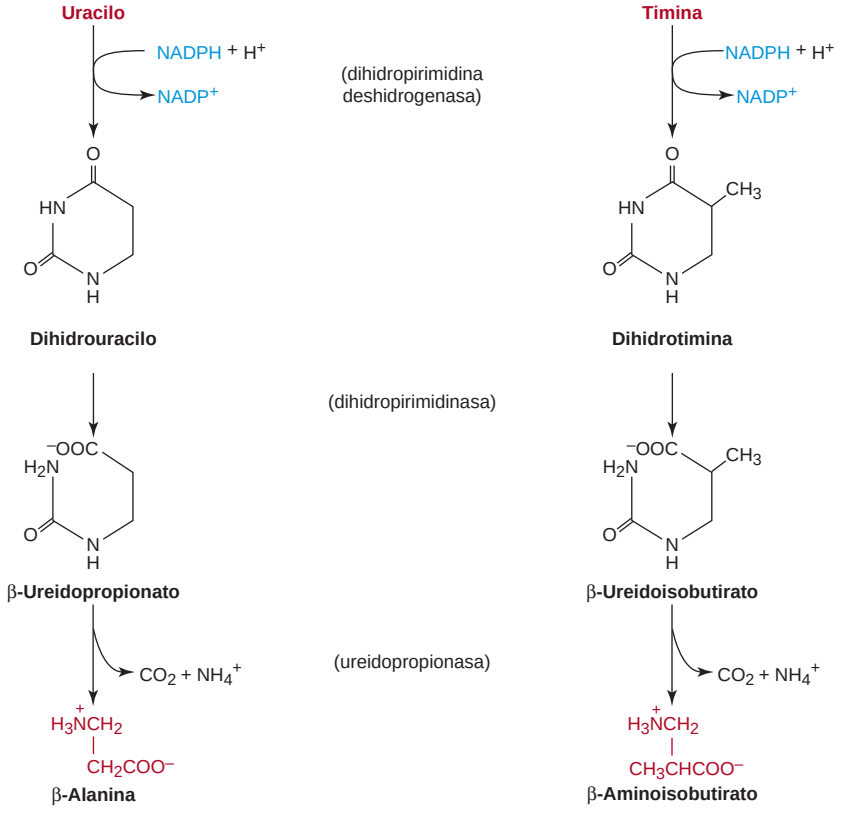


FIGURA 19.32
Degradación del uracilo y la timina a sus productos finales.

CO_2. El ácido β-aminoisobutírico es excretado en la orina humana, y se origina exclusivamente a partir de la degradación de la timina. Se puede, por tanto, estimar el recambio de DNA o de los nucleótidos de desoxitimidina midiendo la excreción de ácido β-aminoisobutírico. Pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia o radioterapia, procesos en los que se matan grandes cantidades de células y se degrada DNA, excretan niveles aumentados de ácido β-aminoisobutírico.

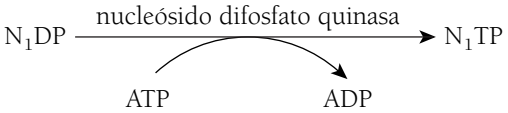
Los enzimas que catalizan la degradación del uracilo y la timina (**dihidropirimidina deshidrogenasa**, **dihidropirimidinasa** y **ureidopropionasa**) no muestran ninguna preferencia por el uracilo, la timina, o sus productos de reacción.

19.7 | NUCLEÓSIDO Y NUCLEÓTIDO QUINASAS

La síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos y pirimidínicos, conduce a los nucleósidos 5′-monofosfato (véanse Figuras 19.7 y 19.19). De modo parecido, la recuperación de las nucleobases vía fosforribosiltransferasas o de nucleósidos vía nucleósido quinasas también forman nucleósido 5′-monofosfatos. Esto es particularmente importante en una célula como el eritrocito que no puede formar nucleótidos *de novo*.

Además de las nucleósido quinasas, existen nucleótido quinasas que convierten los nucleósido 5′-monofosfatos en nucleósido 5′-difosfatos y los nucleósido 5′-difosfatos en nucleósido 5′-trifosfatos. Estas son reacciones importantes, ya que la mayoría de las reacciones en que intervienen nucleótidos requieren nucleósido 5′-trifosfatos (principalmente) o nucleósido 5′-difosfatos.

Las nucleósido quinasas muestran un elevado nivel de especificidad con respecto a la base y el azúcar. Las nucleótido quinasas presentan también especificidad de sustrato. Las células de mamíferos contienen, en concentración elevada, nucleósido difosfato quinasa, que es relativamente inespecífica, tanto para el dador de fosfato como para el aceptor de fosfato, en términos de base purínica o pirimidínica o del azúcar. La reacción es la siguiente:



Dado que el ATP está presente en la mayor concentración y se regenera más fácilmente, en términos de cantidad neta, a través de la glucólisis o la fosforilación oxidativa, este nucleótido es, probablemente, el principal dador de fosfatos de estas reacciones.

19.8 | ENZIMAS METABOLIZANTES DE NUCLEÓTIDOS EN FUNCIÓN DEL CICLO CELULAR Y DE LA VELOCIDAD DE DIVISIÓN CELULAR

Para que tenga lugar una división celular, prácticamente se han de duplicar todos los componentes de la célula. Los acontecimientos que van desde la formación de una célula hija como resultado de la mitosis hasta la finalización de los procesos requeridos para su propia división en dos células hijas se definen con el término **ciclo celular**. El ciclo celular se representa en la Figura 19.33 (véase también la p. 178). Las fases del ciclo celular son mitosis (M), gap 1 (G1) (gap = "hueco"), síntesis (S) y gap 2 (G2). Algunas células pueden entrar en G0, estado en el que son viables y funcionales, pero se hallan en un estado quiescente o no proliferativo. El período total del ciclo celular varía con el tipo concreto de célula. En muchas células de mamíferos, los períodos de tiempo para las fases M, S y G2 son relativamente constantes, mientras que el tiempo en fase G1 varía en ellas ampliamente, lo que hace que estas células tengan tiempos de duplicación largos o cortos. Existen muchos "factores" que hacen que las células salgan del estado G0 y reentren en el ciclo celular. En la preparación para la **replicación del DNA** (fase S), hay un incremento considerable en la síntesis de enzimas implicados en el metabolismo de nucleótidos, especialmente durante la fase G1 final/S temprana. Mientras que la síntesis de RNA y de proteínas tiene lugar de forma continuada durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular, la replicación del DNA sólo tiene lugar durante la fase S.

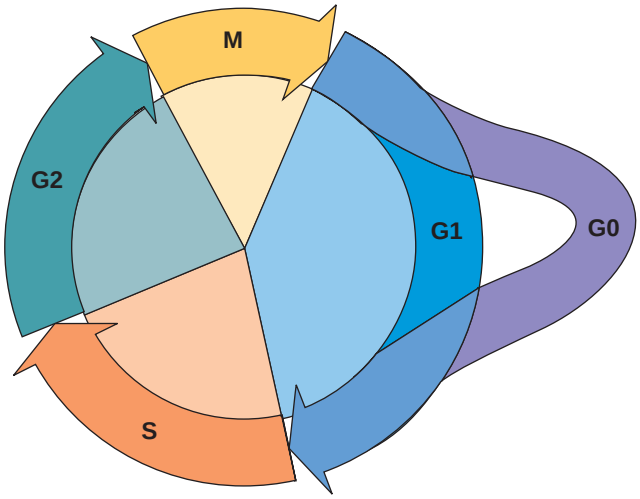


FIGURA 19.33
Representación diagramática del ciclo celular. Para una célula de mamífero con un tiempo de duplicación de 24 h, G1 consumiría ~12 h; S, 7 h; G2, 4 h; y M, 1 h. Las células entran en el estado G0 si se vuelven quiescentes o no proliferativas.

Los niveles de los enzimas de la síntesis de nucleótidos purínicos y pirimidínicos se elevan durante la fase S

La regulación estricta de la síntesis de nucleótidos exige que existan ciertos mecanismos por los que la célula satisfaga las necesidades de precursores de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos en el momento en que se incrementa la síntesis de RNA y la replicación del DNA. Para satisfacer estas necesidades, la célula responde aumentando los niveles de enzimas específicos implicados en la formación de nucleótidos durante períodos muy específicos del ciclo celular.

Los enzimas que están implicados en la síntesis e interconversiones de nucleótidos purínicos y que se encuentran incrementados en la fase S del ciclo celular son la PRPP amidotransferasa y la IMP deshidrogenasa. No aumentan ni la adenilosuccinato sintetasa ni la adenilosuccinasa. Los enzimas implicados en la síntesis de nucleótidos pirimidínicos que se incrementan durante la fase S son la aspartato carbamiltransferasa, dihidroorotasa, dihidroorotato deshidrogenasa, orotato fosforribosiltransferasa y CTP sintetasa. Muchos de los enzimas implicados en la síntesis e interconversiones de desoxirribonucleótidos también están incrementados durante la fase S. Entre estos enzimas se encuentran la ribonucleótido reductasa, la timidina quinasa, la dCMP desaminasa, la timidilato sintasa y la TMP quinasa.

Tal como ya se ha descrito previamente, la reserva de desoxirribonucleótidos es sumamente pequeña en las células "en reposo" (inferior a 1 μM). Debido al incremento de los niveles de ribonucleótido reductasa, la concentración de desoxirribonucleótidos alcanza valores de 10 a 20 μM durante la síntesis de DNA. No obstante, esta concentración sólo podría mantener la síntesis de DNA durante unos minutos, mientras que la replicación completa del DNA requiere horas. En consecuencia, los niveles de actividad ribonucleótido reductasa no sólo han de aumentar, sino que deben mantenerse durante la fase S con el fin de proporcionar los sustratos necesarios para la síntesis de DNA.

Los tejidos en crecimiento tales como el hígado en regeneración, los tejidos embrionarios, las células de la mucosa intestinal y las células eritropoyéticas están orientadas hacia la replicación de DNA y síntesis de RNA. Estos tejidos muestran niveles elevados de los enzimas clave implicados en la síntesis e interconversiones de nucleótidos purínicos y pirimidínicos, y descensos complementarios en los niveles de enzimas que catalizan reacciones en las que se degradan los precursores. Estos cambios reflejan la proporción de las células del tejido que se encuentran en la fase S.

Existe un patrón ordenado de cambios bioquímicos que tienen lugar en las células tumorales. Utilizando una serie de tumores de hígado, de colon y de riñón con diferentes velocidades de crecimiento, ha sido posible definir estos cambios bioquímicos como (1) **ligados a transformación** (lo que indica que todos los tumores muestran, independientemente de su velocidad de crecimiento, ciertos niveles enzimáticos incrementados y ciertos niveles disminuidos); (2) **ligados a progresión** (alteraciones que se correlacionan con la velocidad de crecimiento del tumor); y (3) **alteraciones**

coincidentes (no relacionadas con el estado de malignidad). Como ejemplo, los niveles de ribonucleótido reductasa, timidilato sintasa e IMP deshidrogenasa aumentan en función de la velocidad de crecimiento del tumor. La PRPP amidotransferasa, UDP quinasa y uridina quinasa son ejemplos de enzimas cuya actividad se incrementa en todos los tumores, sean de crecimiento lento, o de crecimiento más rápido.

Las alteraciones de la expresión génica en las células tumorales no sólo son cambios cuantitativos en niveles de enzimas, sino también cambios cualitativos (desplazamientos de isozimas). Mientras que ciertos enzimas incrementan su concentración tanto en el tejido normal de crecimiento rápido (p. ej., embrionario, hígado en regeneración), como en los tumores, se pueden distinguir los patrones cuantitativos y cualitativos globales de los tejidos normales y de los tumorales.

19.9 | SÍNTESIS DE COENZIMAS NUCLEOTÍDICOS

El dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD), el dinucleótido de adenina y flavina (FAD) y el coenzima A (CoA) son coenzimas importantes en el metabolismo intermediario. Estos coenzimas se sintetizan en varios tipos de células de mamíferos. Las Figuras 19.34, 19.35 y 19.36 muestran las rutas biosintéticas de cada uno

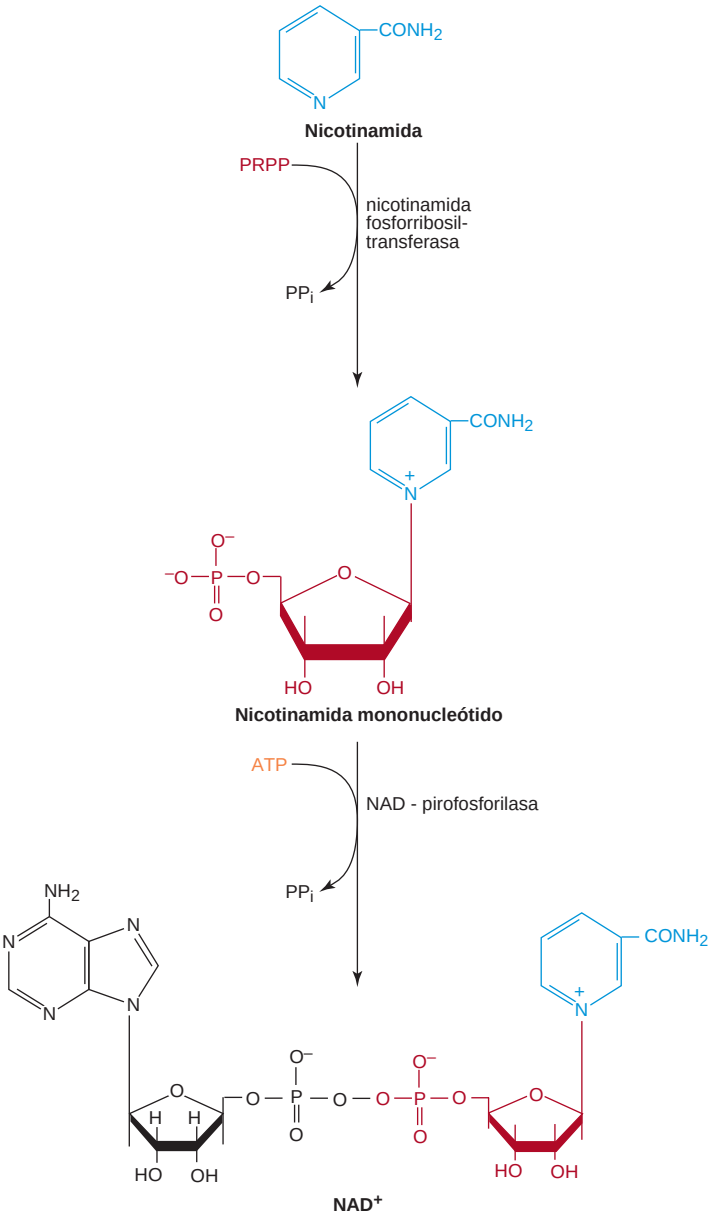


FIGURA 19.34
Ruta de la síntesis de NAD^+.

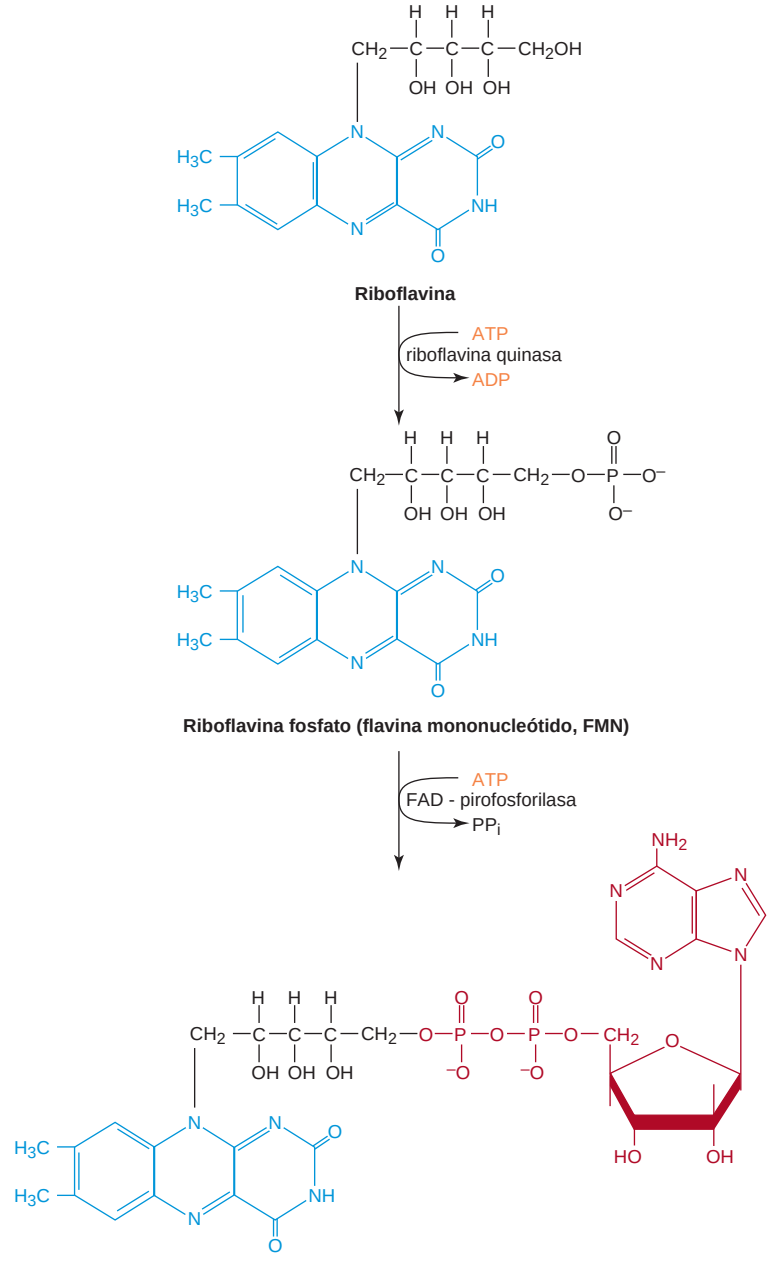


FIGURA 19.35
Síntesis del FAD.

de ellos. La síntesis del NAD requiere nicotinamida, la de FAD requiere riboflavina y la del CoA requiere ácido pantoténico. El NAD puede sintetizarse por tres rutas diferentes, a partir de triptófano (véase p. 808), nicotinato, o nicotinamida. Cuando hay exceso de triptófano con respecto al requerido por la síntesis de proteínas y serotonina (véase p. 810), se utiliza para la síntesis de NAD^+. Esta situación no es probable en la mayoría de las dietas normales y en consecuencia es necesario el aporte de nicotinamida en la dieta.

Cada uno de estos coenzimas contiene una porción AMP como parte de la molécula que no está directamente implicada en la parte funcional de la molécula, puesto que la transferencia de electrones en el NAD o el FAD tiene lugar a través de los anillos de la nicotinamida o la riboflavina, respectivamente, y la activación de los grupos acilo tiene lugar a través de los grupos —SH del CoA. La síntesis de NAD^+ por cualquiera de las tres rutas requiere de la utilización de PRPP como dador de ribosa 5-fosfato. El dinucleótido fosfato de adenina y nicotinamida ($NADP^+$)

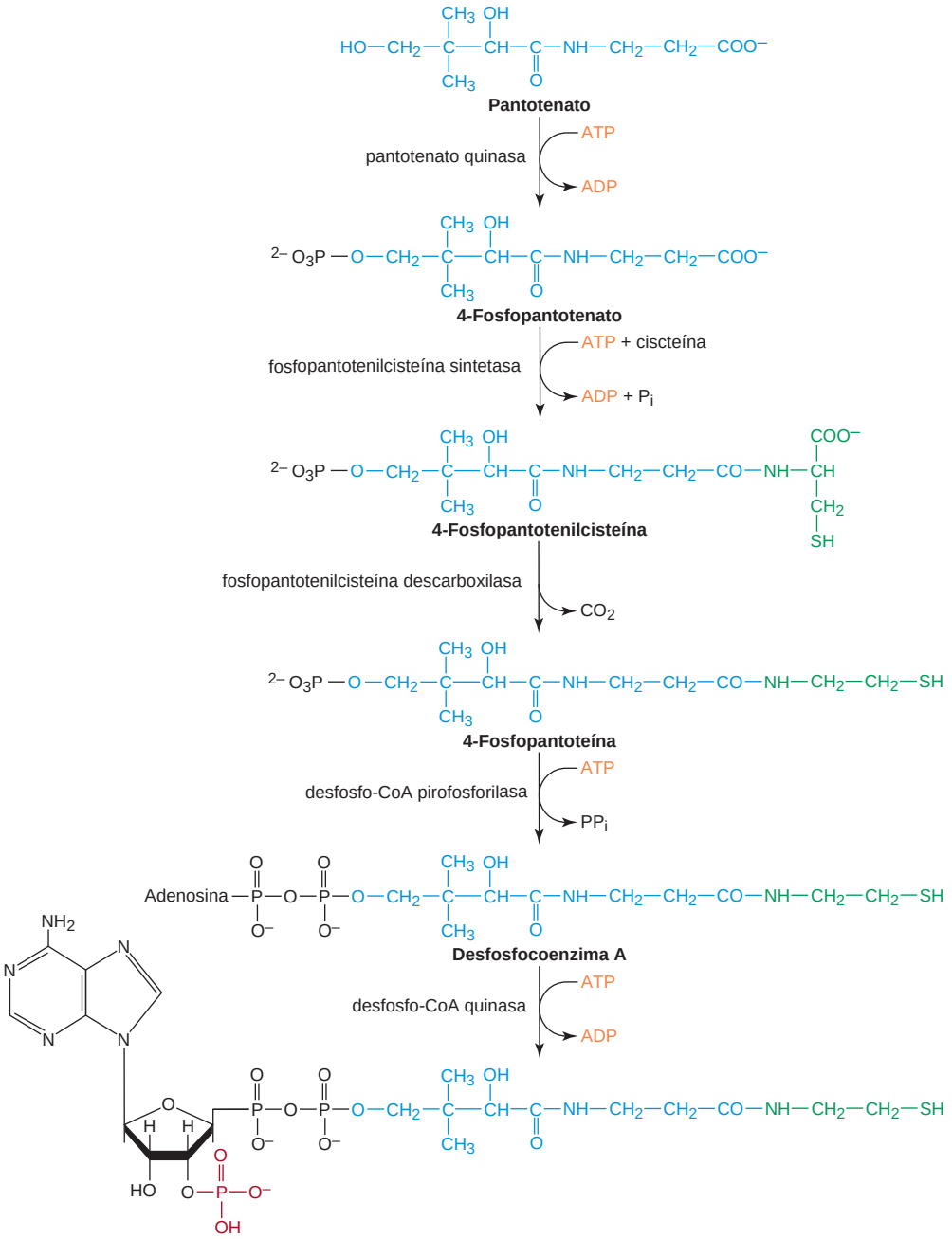


FIGURA 19.36
Síntesis del coenzima A.

se sintetiza por fosforilación a partir del NAD^+. El NAD^+ no sólo se utiliza como cofactor en reacciones de oxidación–reducción sino también como sustrato en las reacciones de ADP-ribosilación (como por ejemplo, la reparación del DNA y la intoxicación por la toxina pertussis; véase p. 255). Estas reacciones conducen a la renovación del NAD^+. El producto final de la degradación del NAD^+ es la 2-piridona-5-carboxamida, que es excretada en la orina.

La síntesis de los coenzimas nucleotídicos está regulada de manera que las concentraciones de estos coenzimas en la célula son esencialmente "fijas". Cuando se afirma que alguna situación metabólica está favorecida cuando la concentración de NAD^+ es baja, significa que la concentración de NADH es alta en la proporción correspondiente. Un ejemplo de ello está en la glucólisis anaeróbica en la que el NAD^+ ha de ser regenerado constantemente mediante reducción del piruvato a lactato por la lactato deshidrogenasa (véase p. 609).

19.10 SÍNTESIS Y UTILIZACIÓN DEL 5-FOSFORRIBOSIL-1-PIROFOSFATO

El **5-fosforribosil-1-pirofosfato** (PRPP) es una molécula clave en la síntesis *de novo* de los nucleótidos de purina y pirimidina, en la recuperación de las bases purínicas y pirimidínicas, y en la síntesis de NAD^+. La PRPP sintetasa cataliza la reacción que se muestra en la Figura 19.37. La ribosa 5-fosfato utilizada en esta reacción se genera a partir del metabolismo de la glucosa 6-fosfato vía **ruta de las pentosas fosfato**, o a partir de la ribosa 1-fosfato generada por fosforólisis de nucleósidos vía nucleósido fosforilasa.

La PRPP sintetasa tiene una necesidad absoluta de fosfato inorgánico y está fuertemente regulada. La curva de velocidad frente a $[P_i]$ de la PRPP-sintetasa no es hiperbólica sino sigmoidea, por lo que, a la concentración de P_i hallada normalmente en la célula, la actividad se halla reprimida. La actividad del enzima está regulada además por el ADP, el 2,3-bisfosfoglicerato y otros nucleótidos. El ADP es un inhibidor competitivo de la PRPP sintetasa con respecto al ATP; el 2,3-bisfosfoglicerato es un inhibidor competitivo con respecto a la ribosa 5-fosfato; los nucleótidos son inhibidores no competitivos con respecto a ambos sustratos. El 2,3-bisfosfoglicerato puede ser importante en la regulación de la PRPP sintetasa en los eritrocitos.

Los niveles de PRPP son bajos cuando las células se encuentran en estado de "reposo" o confluencia, mientras que se incrementan rápidamente cuando las células están en rápida división. El incremento en el flujo de glucosa 6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato incrementa los niveles intracelulares de PRPP y aumenta la producción de nucleótidos de purina y pirimidina. El PRPP es importante no solamente por servir de sustrato para las reacciones de la glutamina PRPP amidotransferasa y la fosforribosiltransferasa, sino también como efector positivo en los principales pasos regulados de la síntesis de los nucleótidos de purina y pirimidina, esto es, la PRPP amidotransferasa y la carbamil fosfato sintetasa II.

Las reacciones y las vías en que es requerido el PRPP son las siguientes:

1. Síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos
   a. PRPP + glutamina → 5-fosforribosilamina + glutamato + PP_i
2. Recuperación de bases purínicas
   a. PRPP + hipoxantina (guanina) → IMP (GMP) + PP_i
   b. PRPP + adenina → AMP + PP_i
3. Síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos
   a. PRPP + orotato → OMP + PP_i
4. Recuperación de bases pirimidínicas
   a. PRPP + uracilo → UMP + PP_i
5. Síntesis de NAD^+
   a. PRPP + nicotinato → nicotinato mononucleótido + PP_i
   b. PRPP + nicotinamida → nicotinamida mononucleótido + PP_i
   c. PRPP + quinolinato → nicotinato mononucleótido + PP_i

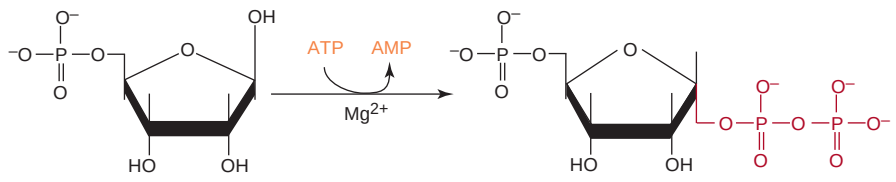
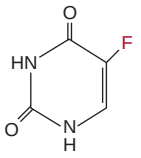
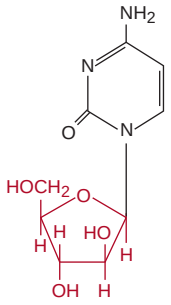


FIGURA 19.37
Síntesis del PRPP.

6-Mercaptopurina



5-Fluorouracilo



Citosina arabinósido

FIGURA 19.38
Estructuras de la 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo y citosina arabinósido.

19.11 | COMPUESTOS QUE OBSTACULIZAN EL METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS Y PIRIMIDÍNICOS: SU UTILIZACIÓN COMO AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

La síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos y pirimidínicos es crítica para la replicación, mantenimiento y función celular normales. La regulación de estas vías es importante ya que defectos en los enzimas reguladores producen estados patológicos. Se han sintetizado o aislado (como productos naturales de plantas, hongos o bacterias) muchos compuestos que son análogos estructurales de las bases o de los nucleósidos utilizados en las reacciones metabólicas. Estos compuestos son inhibidores relativamente específicos de enzimas implicados en la síntesis o interconversión de nucleótidos y han demostrado su utilidad en la terapia de problemas clínicos diversos. Generalmente se clasifican en antimetabolitos, antifolatos, antagonistas de la glutamina y otros compuestos.

Los antimetabolitos son análogos estructurales de las bases o nucleósidos

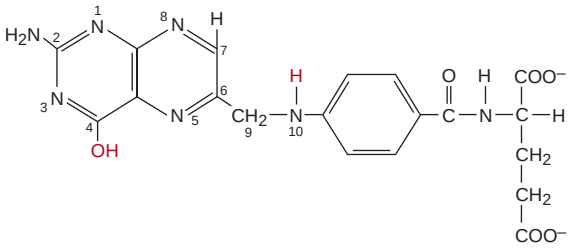
Los **antimetabolitos** son, generalmente, análogos estructurales de las bases o nucleósidos purínicos y pirimidínicos que interfieren en reacciones metabólicas muy específicas. Entre ellos se incluyen la **6-mercaptopurina** y la **6-tioguanina**, para el tratamiento de la leucemia aguda; la **azatiopurina**, para la inmunosupresión en pacientes con trasplantes de órganos; el **alopurinol**, para el tratamiento de la gota y la hiperuricemia; y el aciclovir, para el tratamiento de las infecciones por herpesvirus. La comprensión detallada del metabolismo de los nucleótidos purínicos contribuyó al desarrollo de estos fármacos. Recíprocamente, el estudio del mecanismo de acción de estos fármacos ha conducido a una mayor comprensión del metabolismo normal de los nucleótidos en el hombre.

Discutiremos tres antimetabolitos para demostrar (1) la importancia de las rutas sintéticas *de novo* en el metabolismo celular normal, (2) que la regulación de estas rutas tiene lugar *in vivo*, (3) el concepto del requisito de la activación metabólica de los fármacos y (4) que la inactivación de estos compuestos influye grandemente en su utilidad.

La **6-mercaptopurina (6-MP)** (Figura 19.38) es un fármaco antitumoral útil para el ser humano. Su actividad citotóxica está relacionada con la formación de 6-mercaptopurina ribonucleótido por la célula tumoral. Utilizando la PRPP y HGPRTasa, el 6-mercaptopurina ribonucleósido 5′-monofosfato se acumula en la célula y actúa como efector negativo de la PRPP-amidotransferasa, etapa de compromiso en la ruta *de novo*. Este nucleótido también actúa como inhibidor de la conversión del IMP en GMP en el paso de la IMP-deshidrogenasa, y de la del IMP a AMP en el paso de la adenilosuccinato sintetasa. Dado que la 6-mercaptopurina es un sustrato de la xantina oxidasa y que es oxidada a ácido 6-tioúrico, se administra generalmente alopurinol para inhibir la degradación de la 6-MP y potenciar las propiedades antitumorales de la 6-MP.

El **5-fluorouracilo (Fura)** (Figura 19.38) es un análogo del uracilo. El fluorouracilo no es la especie activa, sino que debe ser convertido por los enzimas celulares a los metabolitos activos, el 5-fluorouridina 5′-trifosfato (FUTP) y el 5-fluoro-2′-desoxiuridina 5′- monofosfato (FdUMP). El FUTP se incorpora de forma eficiente al RNA y una vez incorporado en éste, inhibe la maduración del precursor 45S del rRNA en las especies 28S y 18S, a la vez que altera el corte y empalme del pre-mRNA a mRNA funcional. El FdUMP es un inhibidor muy potente y específico de la timidilato sintasa. En presencia de timidilato sintasa, H_4folato y FdUMP se forma un complejo ternario que da lugar a la unión covalente del FdUMP a la timidilato sintasa. Esto inhibe la síntesis de dTMP y conduce a una "muerte por carencia de timina" de las células.

El **citosina arabinósido (araC)** (Figura 19.38) se utiliza en el tratamiento de diversas formas de cáncer humano. El araC debe ser metabolizado por enzimas celulares a citosina arabinósido 5′-trifosfato (araCTP) para ejercer sus efectos citotóxicos. El araCTP compite con el dCTP en la reacción de la DNA polimerasa y se in-



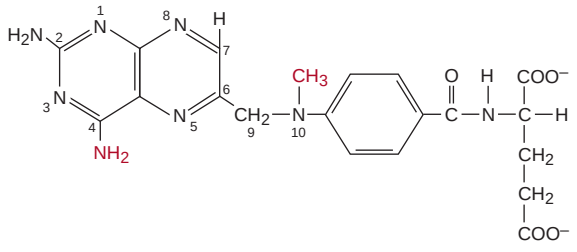


FIGURA 19.39
Comparación de las estructuras del ácido fólico y el metotrexato.

corpora araCMP al DNA. Esto inhibe la síntesis de la hebra de DNA en crecimiento. Clínicamente, la eficacia del araC como antileucémico está correlacionada con la concentración de araCTP que se alcanza en la célula tumoral, que determina la cantidad de araCMP incorporado en el DNA. La formación de araCMP por la desoxicitidina quinasa parece ser el paso limitante de la activación a araCTP.

Los antifolatos inhiben la formación de tetrahidrofolato

Los **antifolatos** interfieren en la formación del H_4folato a partir del H_2folato o del H_2folato a partir de folato por inhibición de la H_2folato reductasa. El **metotrexato (MTX)**, un análogo estructural muy próximo al ácido fólico, es utilizado como agente antitumoral en el tratamiento de cánceres humanos. Las dos estructuras aparecen en la Figura 19.39. MTX y folato difieren en el C-4, donde un grupo amino reemplaza un grupo hidroxilo, y en el N-10, donde un grupo metilo reemplaza un átomo de hidrógeno. El MTX inhibe específicamente la H_2folato reductasa con una K_i del orden de 0,1 nM. Las reacciones inhibidas se muestran en la Figura 19.40.

El MTX es citotóxico a concentraciones muy bajas para células de mamífero en cultivo. La inhibición de la dihidrofolato reductasa por el MTX produce una disminución de las reservas intracelulares tanto de ribonucleósidos 5′-fosfato como de 2′-desoxirribonucleósidos 5′-trifosfatos. Los efectos pueden superarse con la adición al medio de cultivo de desoxitimidina e hipoxantina. La reversión de los efectos del

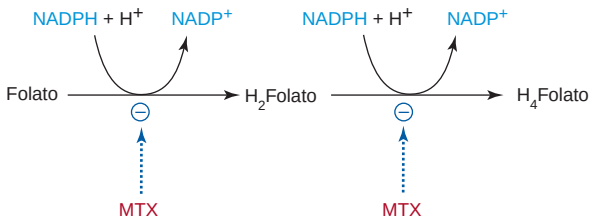


FIGURA 19.40
Sitios de inhibición del metotrexato.

MTX por estos compuestos indica que el MTX causa la desaparición de la desoxitimidina y de los nucleótidos purínicos en la célula. La Figura 19.41 muestra la relación entre el H_4folato, la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina y la formación de dTMP. Es importante destacar que en la reacción de la timidilato sintasa se genera H_2folato y, a menos que pueda ser rápidamente reducido de nuevo a H_4folato, por acción de la dihidrofolato reductasa, las células no serán capaces de efectuar la síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos o la síntesis del timidilato, debido al agotamiento de las reservas de H_4folato.

En el tratamiento de leucemias humanas, los efectos tóxicos de las "altas dosis de MTX" en las células normales pueden evitarse con el N^5-formil-H_4folato (**leucovorina**), lo que incrementa la eficacia clínica del tratamiento con MTX.

Los antagonistas de la glutamina inhiben los enzimas que utilizan glutamina como dador de nitrógeno

En las células de mamíferos tienen lugar muchas reacciones en las que la glutamina actúa como dador de grupos amino. Esto contrasta con las bacterias, que utilizan principalmente el amoníaco como dador de amino en reacciones similares. Estas reacciones de amidación son muy críticas para la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos (N-3 y N-9), síntesis del GMP a partir del IMP, en la formación del carbamil fosfato citosólico, síntesis de CTP a partir de UTP y en la síntesis de NAD^+.

Los compuestos que inhiben estas reacciones se conocen como antagonistas de la glutamina. La **azaserina** (*O*-diazoacetil-L-serina) y la **6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON)** (Figura 19.42), aisladas originalmente de cultivos de *Streptomyces*, son inhibidores muy efectivos de los enzimas que utilizan glutamina como dador de amino. Dado que la azaserina y el DON inactivan los enzimas involucrados, la adición de glutamina sola no puede contrarrestar los efectos de estos dos fármacos. Se precisaría la utilización de muchos tipos de metabolitos, tales como la guanina, citidina, hipoxantina (o adenina) y nicotinamida para contrarrestar los muchos centros bloqueados por estos antagonistas de la glutamina. Tal como es de esperar en base a la multiplicidad de centros de inhibición en etapas clave por el DON y la azaserina estos agentes son extremadamente tóxicos y no son utilizados clínicamente.

Otros agentes inhiben el crecimiento celular al interferir con el metabolismo de los nucleótidos

Las células tumorales tratadas con **hidroxiurea** (Figura 19.43) muestran una inhibición específica de la síntesis de DNA, sin que ello tenga efecto, o lo tenga apenas, sobre la síntesis de RNA o de proteínas. La hidroxiurea es un inhibidor de la ribonucleótido reductasa, que bloquea la reducción de CDP, UDP, GDP y ADP a los

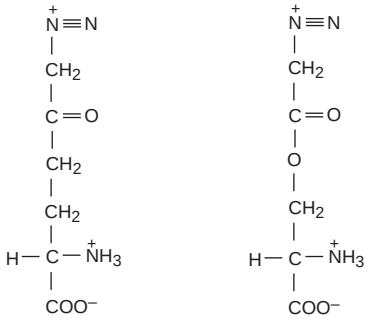


FIGURA 19.42
Estructura de antagonistas de la glutamina.

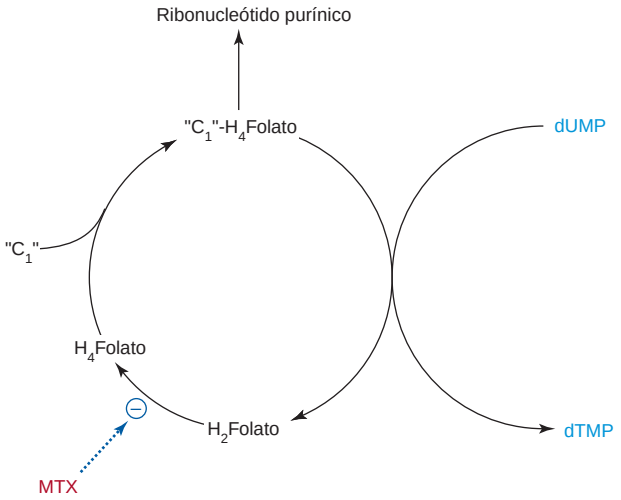


FIGURA 19.41
Relación entre el H_4folato, la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos y la síntesis de dTMP.

2′-desoxirribonucleósido 5′-difosfatos correspondientes. La toxicidad de este fármaco proviene de la desaparición de los 2′-desoxirribonucleósido 5′-trifosfatos necesarios para la replicación del DNA. El uso clínico de la hidroxiurea como agente antitumoral se halla limitado debido a su rápida velocidad de eliminación y a la elevada concentración necesaria para la inhibición efectiva. No obstante, se ha utilizado recientemente la hidroxiurea en el tratamiento de la anemia falciforme. Mediante un mecanismo desconocido, el tratamiento con hidroxiurea de pacientes de anemia falciforme conduce a la activación del gen de la hemoglobina fetal (γ) lo que da como resultado un aumento en la expresión de la hemoglobina fetal. El aumento en la expresión de la hemoglobina fetal disminuye la frecuencia de las crisis de la célula falciforme en los pacientes. No parece que los efectos de la hidroxiurea en los eritrocitos falciformes estén directamente relacionados con la inhibición de la ribonucleótido reductasa.

La **tiazofurina** (Figura 19.43) se convierte, por acción de enzimas celulares, en el análogo del NAD^+ **tiazofurina adenina dinucleótido** (TAD). Éste inhibe la IMP deshidrogenasa, el enzima limitante en la síntesis de GTP, con una K_i de 0,1 μM. A causa de dicha inhibición, la concentración de GTP disminuye notablemente. Es interesante que, aunque hayan en las células muchas deshidrogenasas que utilizan NAD^+ como sustrato, sea la IMP deshidrogenasa el enzima más afectado. Esto podría ser debido a que la IMP deshidrogenasa cataliza un paso limitante de velocidad de una ruta y que, además, su concentración sea cuantitativamente limitante.

Estos fármacos de uso clínico sirven para ilustrar cómo el conocimiento de las rutas y mecanismos bioquímicos básicos ha conducido a la generación de fármacos efectivos.

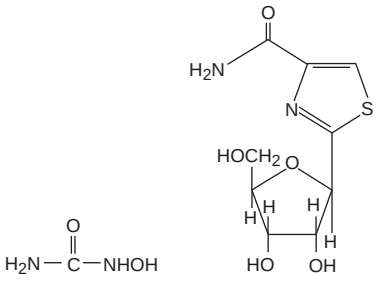


FIGURA 19.43
Estructuras de la hidroxiurea y la tiazofurina.

Análogos de purinas y pirimidinas como agentes antivíricos

Las infecciones por el **herpesvirus** (HSV) y el **virus de inmunodeficiencia humana** (VIH), agente causal de las infecciones de SIDA, presentan problemas clínicos sumamente importantes. Se utilizan dos antimetablitos en el tratamiento para controlar (aunque no curar) las infecciones por HSV y VIH. Estos fármacos (Figura 19.44) son el aciclovir (acicloguanosina), un análogo purínico, y el **3′-azido-3′-desoxitimidina (AZT)**, un análogo de pirimidina. Ambos necesitan ser fosforilados metabólicamente para dar el compuesto activo. La acicloguanosina se activa a su monofosfato por acción de una timidina quinasa específica del HSV, codificada por el genoma del virus, que cataliza la fosforilación de la acicloguanosina. La timidina quinasa de las células huésped no puede utilizar aciclovir como sustrato. El acicloguanosina monofosfato es entonces fosforilado por enzimas celulares a las formas di- y trifosfato. Ésta última actúa como sustrato para la DNA polimerasa específica del HSV, y se incorpora a la cadena de DNA vírico en crecimiento, provocando su finalización. La especificidad de la acicloguanosina y su alto potencial terapeútico se basa, por tanto, en que sólo las células infectadas por HSV pueden formar el acicloguanosina monofosfato.

El AZT es fosforilado por quinasas celulares a AZT-trifosfato que bloquea la replicación del VIH al inhibir la DNA polimerasa del virus (que es una polimerasa dependiente de RNA). La selectividad del AZT hacia las células infectadas por VIH respecto a las no infectadas se debe a que la DNA polimerasa del VIH es por lo menos 100 veces más sensible al AZT-trifosfato que la DNA polimerasa dependiente de DNA de la célula huésped.

Estos dos agentes antivíricos ilustran la diversidad de respuestas requeridas para la selectividad. En un caso (el de la acicloguanosina), la actividad enzimática codificada por el genoma del virus es imprescindible para la activación del fármaco; en el segundo ejemplo (el del AZT), aun cuando enzimas celulares activan el fármaco, el producto del gen vírico (la DNA polimerasa del VIH) es la diana selectiva.

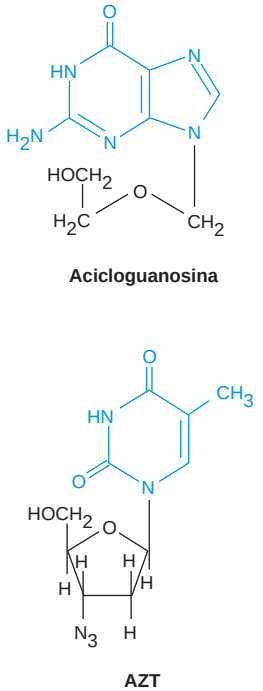


FIGURA 19.44
Estructuras de los agentes antivíricos aciclovir y AZT.

Bases bioquímicas del desarrollo de la resistencia a fármacos

El fracaso de la quimioterapia para el tratamiento de los cánceres humanos se relaciona a menudo con el desarrollo de poblaciones de células tumorales resistentes a los efectos citotóxicos del fármaco en cuestión. Los tumores contienen una población celular muy heterogénea, y a menudo ya existen en ellos células resistentes a fármacos. Esta población de células resistentes se enriquece a medida que el fár-

maco va matando las células sensibles. En algunos casos, el tratamiento con fármacos provoca alteraciones genéticas que originan un fenotipo de resistencia a fármacos. La resistencia a fármacos se puede clasificar en "resistencia a fármaco específico", y la "**resistencia multifármacos**".

Los mecanismos bioquímicos y moleculares que dan lugar a resistencia a fármacos han sido determinados para muchos de ellos. Por ejemplo, la resistencia a metotrexato puede ser el resultao de diversas alteraciones diferentes. Entre ellas se encuentran: el descenso en la captación de MTX debido a una pérdida o un defecto del transportador de N^5-formil-H_4folato y N^5-metil-H_4folato; la amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa, que provoca un incremento de la cantidad de enzima diana, la dihidrofolato reductasa; un gen para la dihidrofolato reductasa alterado, que produce una dihidrofolato reductasa "mutante" menos sensible a la inhibición por MTX; y finalmente, una actividad folilpoliglutamato sintetasa disminuida, que se traduce en niveles menores de MTX poliglutamilado, la forma "cautiva" del MTX. Una población resistente al MTX puede tener una cualquiera de estas alteraciones, o una combinación de ellas. El efecto neto de cualquiera de estos mecanismos de resistencia es reducir la capacidad del MTX para inhibir la dihidrofolato reductasa a una concentración de MTX que sea viable clínicamente. Podríamos describir otros mecanismos específicos de resistencia a fármacos para compuestos tales como el citosina arabinósido, 5-fluorouracilo e hidroxiurea.

En la resistencia múltiple a fármacos, la población resistente al fármaco tiene una resistencia entrecruzada a una serie de agentes antitumorales aparentemente no relacionados. Entre estos compuestos se incluyen los alcaloides de la vinca, adriamicina, actinomicina D y etopósido. Todos estos medicamentos son productos naturales o derivados de productos naturales y no tienen una estructura química relacionada. Todos tienen diferentes mecanismos de acción como agentes antitumorales pero parece ser que actuan sobre algún acontecimiento nuclear.

Las células tumorales que presentan resistencia múltiple a fármacos expresan niveles elevados (en comparación con las células tumorales con fenotipo sensible a fármacos) de una proteína denominada **MDR1** (glucoproteína P) o de otra proteína denominada **MRP (proteína de resistencia múltiple a fármacos)**. Véase p. 525 para una discusión sobre estos transportadores. Estas proteínas se hallan ancladas a la membrana y tienen una masa molecular de alrededor de 170 kDa, pero constituyen dos proteínas claramente diferenciadas. Funcionan como **"bombas" dependientes de ATP** para evacuar fármacos de las células. Como resultado la concentración celular del fármaco se ve disminuida por debajo de su concentración citotóxica.

El desarrollo de células tumorales resistentes a fármacos causa graves problemas clínicos. El estudio del mecanismo de resistencia a fármacos ha sido de gran ayuda en el conocimiento de las células tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

Arner, E. S. J. y Eriksson, S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.* 67:155, 1995.

Cory, J. G. Role of ribonucleotide reductase in cell division. En: J. G. Cory y A. H. Cory (Eds.), *Inhibitors of Ribonucleoside Diphosphate Reductase Activity, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.* New York: Pergamon Press, 1989, p. 1.

Elion, G. B. The purine path to chemotherapy. *Science* 244:41, 1989.

Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. y Valle, D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed. Vol. II, Chaps. 49–55. New York: McGraw-Hill, 1995.

Weber, G. Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy: *G.H.A. Clowes Mem. Lecture Cancer Res.* 43:3466, 1983.

Zalkin, H. y Dixon, J. E. *De novo* purine nucleotide biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res.* 42:259, 1992.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Los nucleótidos pueden desempeñar todas las siguiente funciones, EXCEPTO:
   A. unidades monoméricas de los ácidos nucleicos.
   B. mediadores fisiológicos.
   C. fuentes de energía química.
   D. componentes estructurales de las membranas.
   E. componentes estructurales de coenzimas.
2. El nitrógeno amídico de la glutamina actúa como fuente de nitrógeno en la:
   A. síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos.
   B. síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos.

A. síntesis de GMP a partir de IMP.
C. todas las anteriores.
D. ninguna de las anteriores.

3. Los dos nucleótidos purínicos presentes en el RNA:
   A. se forman a partir de un intermediario común en una ruta ramificada.
   B. se forman en una ruta secuencial.
   C. deben provenir de fuentes exógenas.
   D. se forman por oxidación de las formas desoxi.
   E. se sintetizan a partir de precursores no purínicos por rutas totalmente independientes.

4. El tipo de enzima denominado fosforribosiltransferasa está implicado en todo lo siguiente, EXCEPTO:
   A. la recuperación de bases pirimidínicas.
   B. la síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos.
   C. la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos.
   D. la recuperación de bases purínicas.

5. El ácido úrico:
   A. se forma a partir de xantina en presencia de O_2.
   B. es un producto de degradación de la citidina.
   C. es deficiente en la condición conocida como gota.
   D. es un inhibidor competitivo de la xantina oxidasa.
   E. en el hombre se oxida antes de ser excretado a través de la orina.

6. En la degradación de los ácidos nucleicos, todo lo siguiente es correcto, EXCEPTO:
   A. actúan nucleasas específicas para el DNA o para el RNA.
   B. las nucleotidasas convierten los nucleótidos en nucleósidos.
   C. la conversión de un nucleósido a base libre es un ejemplo de hidrólisis.
   D. se forma hipoxantina, en vez de adenina, debido a la presencia de desaminasas.
   E. una deficiencia de adenosina desaminasa conduce a inmunodeficiencia.

7. Los desoxirribonucleótidos:
   A. no pueden sintetizarse y por consiguiente deben ser aportados a través de la dieta.
   B. se sintetizan *de novo* utilizando dPRPP.
   C. se sintetizan a partir de los ribonucleótidos mediante un sistema enzimático en el que interviene la tiorredoxina.
   D. se sintetizan a partir de los ribonucleótidos mediante las nucleótido quinasas.
   E. sólo se pueden formar por recuperación de las bases libres.

8. La conversión de nucleósido 5′-monofosfatos en nucleósido 5′-trifosfatos:
   A. es catalizada por nucleósido quinasas.
   B. es una reacción de equilibrio directa.
   C. utiliza una nucleótido quinasa relativamente específica y una nucleósido difosfato quinasa relativamente inespecífica.
   D. generalmente utiliza GTP como dador de fosfato.
   E. tiene lugar solamente durante la fase S del ciclo celular.

9. Si una célula fuese incapaz de sintetizar PRPP, ¿cuál de los siguientes procesos sería de esperar que estuviese directamente afectado?
   A. la síntesis de FAD.
   B. la síntesis de NAD.
   C. la síntesis del coenzima A.
   D. la síntesis de ribosa 5-fosfato.
   E. la síntesis de dTMP.

10. ¿Cuál de los siguientes agentes quimioterapéuticos actúa impidiendo la síntesis *de novo* de purinas?
    A. el aciclovir (acicloguanosina).
    B. el 5-fluorouracilo (antimetabolito).
    C. el metotrexato (antifolato).
    D. la hidroxiurea.
    E. el AZT (3′-azido-3′-desoxitimidina).

Preguntas 11 y 12: La aciduria orótica hereditaria se caracteriza por anemia grave, retraso en el crecimiento y niveles elevados de excreción de ácido orótico. El defecto puede encontrarse en la orotato fosforribosiltransferasa, en la orotidina descarboxilasa, o en ambas. El tratamiento de elección para esta enfermedad es la uridina en la dieta, la cual revierte la anemia y disminuye la formación de ácido orótico.

11. Entre los elementos implicados en la efectividad del tratamiento con la dieta se encuentran:
    A. conversión de la uridina exógena en UMP por la uridina fosfotransferasa.
    B. el UTP de la uridina exógena proporciona sustratos para la síntesis de CTP.
    C. inhibición de la carbamil fosfato sintetasa II por el UTP.
    D. todos los anteriores.
    E. ningunos de los anteriores.

12. En la síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos:
    A. las reacciones tienen lugar exclusivamente en el citosol.
    B. se forma una base libre como intermediario.
    C. se requiere PRPP en el paso limitante de velocidad.
    D. el UMP y el CMP se forman a partir de un intermediario común.
    E. la inhibición de la OMP descarboxilasa por el UMP es el principal control del proceso.

Preguntas 13 y 14: La gota es una enfermedad que se caracteriza por hiperuricemia debido a una sobreproducción de nucleótidos purínicos vía la ruta *de novo*. En el síndrome de Lesch-Nyhan, la causa específica es una deficiencia grave de HGPRTasa. Se utiliza alopurinol en el tratamiento de la gota para reducir la producción de ácido úrico. En el síndrome de Lesch-Nyhan, la disminución de ácido úrico se contrarresta con un incremento de xantina más hipoxantina en la sangre. En otras formas de gota, la disminución de ácido úrico es superior al incremento de xantina más hipoxantina.

13. La explicación de esta diferencia en las dos formas de gota es:
    A. es un artefacto experimental y el descenso de ácido úrico y el incremento de xantina más hipoxantina en la gota no Lesch-Nyhan es el mismo.
    B. el alopurinol es menos efectivo en la gota no Lesch-Nyhan
    C. hay un incremento en la excreción de xantina e hipoxantina en la gota no Lesch-Nyhan.
    D. los niveles de PRPP están disminuidos en Lesch-Nyhan.
    E. en la gota no Lesch-Nyhan se recuperan la xantina e hipoxantina a IMP y XMP y se inhibe la PRPP amidotransferasa.

14. ¿Cuál de los siguientes aspectos hace referencia a la regulación global de la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos?
    A. el AMP, GMP e IMP producen la transición de la forma pequeña a la forma mayor de la PRPP amidotransferasa.
    B. los niveles celulares de PRPP pueden ser varias veces menores que la K_m de la PRPP amidotransferasa respecto al PRPP.
    C. el GMP es un inhibidor competitivo de la IMP deshidrogenasa.
    D. todo lo anterior es correcto.
    E. nada de lo anterior es correcto.

Pregunta 15: La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que puede causar problemas graves debido a la inflamación. La primera lí-

nea de tratamiento son medicamentos antiinflamatorios que pueden controlar los síntomas pero no paran el progreso de la enfermedad. Un tratamiento más agresivo son dosis pequeñas de metotrexato que es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa. Un nuevo fármaco inmunosupresor, el Arava, que es un inhibidor de la dihidroorotato deshidrogenasa, tiene los mismos efectos finales que el metotrexate pero con menos efectos secundarios.

15. ¿Cuál/es de las siguientes frases son correctas?
    A. el metotrexato inhibe la síntesis *de novo* del UMP.
    B. Arava inhibe la síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos.
    C. Arava inhibe la conversión de dUMP en dTMP
    D. Todas las anteriores.
    E. Ninguna de las anteriores.

Problemas

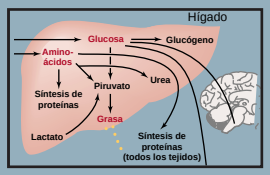
16. Si una célula que puede realizar la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos tiene una cantidad adecuada de AMP pero es deficiente en GMP, cómo regularía la síntesis para incrementar la [GMP]? ¿Qué pasaría si tanto AMP como GMP se encontrasen presentes en las concentraciones adecuadas?
17. ¿Cómo mediría el recambio del DNA?

RESPUESTAS

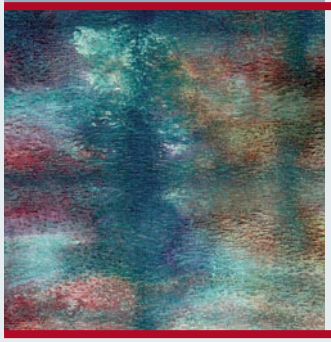
1. **D** Tanto el cAMP como el cGMP son mediadores fisiológicos. El NAD, FAD y el CoA contienen AMP como parte de sus estructuras.
2. **D** Los nitrógenos 3 y 9 de los nucleótidos purínicos y el nitrógeno 3 de los nucleótidos pirimidínicos provienen de la glutamina en la síntesis *de novo*. El grupo 2-amino del GMP también proviene de esta fuente.
3. **A** Tanto el GMP como el AMP se forman a partir del primer nucleótidos purínico, el IMP, en una ruta ramificada. B: Los nucleótidos pirimidínicos UMP y CTP se forman mediante una ruta secuencial a partir del ácido orótico. D: Las formas desoxi se forman por reducción de las formas con ribosa. E: El IMP es el precursor común.
4. **C** En la síntesis de nucleótidos purínicos, el anillo de purina se construye a pasos sobre la ribosa 5-fosfato y no por transferencia sobre el mismo. A, B y D: Las fosforribosiltransferasas son importantes enzimas de recuperación, tanto de purinas como de pirimidinas, y actúan también en la síntesis de pirimidinas, ya que la OPRT cataliza la conversión de orotato a OMP.
5. **A** La reacción de la xantina oxidasa produce ácido úrico. B, E: El ácido úrico es un producto final de las purinas, no de las pirimidinas. C: La gota se caracteriza por un exceso de ácido úrico.
6. **C** Se trata de una fosforólisis. El producto es la ribosa 1-fosfato, no el azúcar libre. A: También son específicas respecto a las bases y los lugares de corte. B: Por hidrólisis directa. D: La AMP desaminasa y la adenosina desaminasa eliminan el 6-NH_2, en forma de amoníaco. El IMP o la inosina formados se convierten en último término en hipoxantina. E: Es la denominada inmunodeficiencia combinada grave
7. **C** Los desoxirribonucleótidos se forman a partir de los ribonucleósidos difosfato mediante la nucleósido difosfato reductasa, enzima que emplea tiorredoxina como dador directo de electrones-hidrógeno. A, B y E: Tal como se acaba de comentar existe un mecanismo sintético, si bien no es una formación *de novo*. D: Las nucleótido quinasas son enzimas que añaden un fosfato a bases o nucleótidos.
8. **C** Estos dos enzimas son importantes para interconvertir las formas nucleotídicas. A: Éstas convierten los nucleósidos en nucleósidos monofosfato. B: Son necesarios dos pasos. D: El ATP está presente en la concentración más alta, y es el dador de fosfato. E: Tiene lugar durante la fase S, pero es una reacción general de la célula.
9. **D** El PRPP se forma a partir de la ribosa 5-fosfato a través de una reacción irreversible. A, B y C: Los tres contienen nucleótidos y requieren PRPP en algún momento E: El dTMP se forma directamente a partir del dUMP, el cual no es necesario que sea obtenido *de novo*.
10. **C** Los antifolatos reducen la concentración de los compuestos de H_4folato que son necesarios para dos pasos de las síntesis de purinas. A y E: Éstos son agentes antivíricos que inhiben la síntesis del DNA. B: El 5-fluorouracilo es un análogo de las pirimidinas, no de las purinas. D: La hidroxiurea inhibe la reducción de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, por lo que no está implicada en la síntesis *de novo* de purinas. E: El alopurinol potencia el efecto de la 6-mercaptopurina, pero no es un inhibidor de la síntesis de purinas
11. **D** Es frecuente que un agente exógeno requiera la conversión en una forma activa; en este caso la uridina es "recuperada" en forma de monofosfato y en último término como trifosfato. La célula es deficiente en UTP y CTP debido a que la conversión del ácido orótico está bloqueada de modo que la uridina exógena proporciona un rodeo alrededor del bloqueo. La formación de ácido orótico está disminuida ya que el UTP inhibe la carbamil fosfato sintetasa II, el enzima de control.
12. **B** A diferencia de la síntesis *de novo* de purinas. A: Uno de los enzimas es mitocondrial. C: El PRPP es necesario para convertir el orotato en OMP, pero no es limitante de la velocidad. D: OMP a UMP y éste a CTP es un proceso secuencial. E: Esta inhibición tiene lugar, pero el paso limitante de velocidad es el catalizado por la CPS II.
13. **E** No sólo está directamente inhibida la producción de ácido úrico, sino también la síntesis *de novo*, reduciéndose de este modo la producción de xantina e hipoxantina. En Lesch-Nyhan el único efecto es la inhibición directa de la xantina oxidasa. A: Es un efecto real. B: De hecho, es más efectivo debido al doble papel. C: Esto no sucede. D: Los niveles de PRPP son muy elevados debido a la falta de recuperación de bases, lo que lleva a una regulación impropia o inexistente de las rutas.
14. **D** Es el mecanismo de inhibición, dado que la forma mayor del enzima es inactiva. B: La PRPP amidotransferasa presenta una cinética sigmoidea respecto al PRPP, de tal forma que grandes variaciones en la concentración de PRPP poseen la capacidad de alterar la velocidad del enzima. C: Desempeña un papel importante en el control de la ruta ramificada que lleva del IMP a GMP o AMP.
15. **B** La conversión del dihidroorotato en ácido orótico es un paso clave en la síntesis *de novo* de los nucleótidos pirimidínicos. A: El metotrexato reduce la reserva de tetrahidrofolato pero el tetrahidrofolato no está implicado en la síntesis *de novo* de pirimidinas. C: Este es el paso inhibido por el metotrexato al disminuir la reserva de tetrahidrofolato.

16 El AMP inhibiría parcialmente la síntesis *de novo* de IMP por inhibición alostérica de la PRPP amidotransferasa. El IMP formado se dirigiría hacia GMP porque el AMP es un inhibidor de su propia síntesis a partir de IMP. Si tanto las concentraciones de AMP como de GMP fuesen las adecuadas el efecto sinergístico de los dos sobre la PRPP amidotransferasa inhibiría severamente la síntesis *de novo*.

17 La timina proviene casi exclusivamente del DNA. La degradación de la timina lleva a un único producto, el β-aminoisobutirato, que es excretado y que puede medirse en la orina.



20



INTERRELACIONES METABÓLICAS

Robert A. Harris y David W. Crabb

20.1 VISIÓN GENERAL 862

20.2 CICLO AYUNO–ALIMENTACIÓN 864

En el estado de buena nutrición, la dieta satisface las demandas energéticas 864
En el estado temprano de ayuno la glucogenólisis hepática es una importante fuente de glucosa en sangre 865
El estado de ayuno requiere gluconeogénesis a partir de aminoácidos y glicerol 866
En el estado temprano de renutrición las grasas se metabolizan normalmente y el metabolismo normal de la glucosa se restablece lentamente 869
Otras importantes interacciones metabólicas entre órganos 870
Necesidades energéticas, reservas y homeostasis calórica 872
La homeostasis de la glucosa tiene cinco fases 875

20.3 MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CONMUTACIÓN DEL METABOLISMO HEPÁTICO ENTRE LOS ESTADOS DE BUENA NUTRICIÓN Y DE INANICIÓN 876

La disponibilidad de sustrato controla muchas rutas metabólicas 877
Efectores alostéricos positivos y negativos regulan enzimas clave 877
La modificación covalente regula enzimas clave 879
Los cambios en los niveles de enzimas clave constituyen un mecanismo adaptativo a largo plazo 883

20.4 INTERRELACIONES METABÓLICAS DE LOS TEJIDOS EN DIVERSOS ESTADOS NUTRICIONALES Y HORMONALES 885

La permanencia en el estado de buena nutrición da como resultado la obesidad y la resistencia a la insulina 885
Diabetes mellitus tipo 2 886
Diabetes mellitus tipo 1 888
Los ejercicios aeróbico y anaeróbico utilizan combustibles diferentes 889
Los cambios en el embarazo están relacionados con las necesidades fetales y con los cambios hormonales 891
La lactancia requiere síntesis de lactosa, triacilglicerol y proteínas 891
El estrés y la lesión conducen a cambios metabólicos 892
La enfermedad hepática provoca importantes desarreglos metabólicos 893
En la enfermedad renal se acumulan desechos de nitrógeno 894
El etanol se oxida en el hígado alterando la relación $NAD^+/NADH$ 895
La glutamina juega un importante papel en el equilibrio ácido–base 896
El colon recupera energía de la dieta 898

BIBLIOGRAFÍA 899

PREGUNTAS 900

RESPUESTAS 901

APLICACIONES CLÍNICAS

20.1 Obesidad 862
20.2 Malnutrición proteica 863
20.3 Inanición 863
20.4 Síndrome de Reye 869
20.5 Coma hiperosmolar hiperglucémico 874
20.6 Hiperglucemia y glucosilación de proteínas 875
20.7 Diabetes mellitus tipo 2 (no dependiente de insulina) 887
20.8 Diabetes mellitus tipo 1 (dependiente de insulina) 888
20.9 Complicaciones de la diabetes y ruta de los polioles 889
20.10 Caquexia cancerosa 893

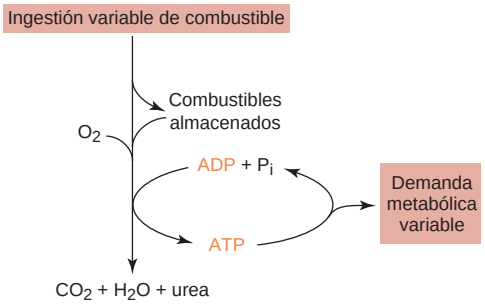


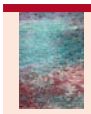
FIGURA 20.1
El ser humano es capaz de utilizar una ingestión variable de combustible para hacer frente a una demanda metabólica variable.

20.1 VISIÓN GENERAL

En este capítulo se recalcará la interdependencia de los procesos metabólicos de los principales tejidos del cuerpo. No todas las rutas metabólicas principales operan en cada tejido en un momento dado. Conocido el estado nutricional y hormonal de un paciente, hemos de saber predecir, al menos cualitativamente, qué rutas metabólicas principales del cuerpo son funcionales y cómo se relacionan entre sí.

Los procesos metabólicos de los que nos ocuparemos son la glucogenogénesis, glucogenólisis, gluconeogénesis, glucólisis, síntesis de ácidos grasos, lipogénesis, lipólisis, oxidación de ácidos grasos, glutaminólisis, actividad del ciclo de los ácidos tricarborxílicos (TCA), cetogénesis, oxidación de aminoácidos, síntesis de proteínas, proteólisis y síntesis de urea. Es importante saber (1) qué tejidos son los más activos en estos diversos procesos, (2) cuándo estos procesos son más activos y cuándo lo son menos, y (3) cómo se controlan estos procesos y cómo se coordinan en diferentes estados metabólicos.

La mejor manera de abordar las relaciones entre las rutas metabólicas es familiarizarse con los cambios que tienen lugar en el metabolismo durante el **ciclo ayuno–alimentación**. Tal como se muestra en la Figura 20.1, el ciclo ayuno–alimentación permite un consumo de combustible y nitrógeno variable para afrontar una demanda metabólica y anábolica variable. Alimentación se refiere a la ingestión de comida (la ingestión variable de combustible), después de la cual almacenamos el combustible (en forma de glucógeno y triacilglicerol) que se utilizará para satisfacer nuestra demanda metabólica mientras no comemos. Obsérvese la participación de un **ciclo del ATP** en el ciclo ayuno–alimentación (Figura 20.1). El ATP funciona como agente de transferencia de energía en el ciclo ayuno–alimentación, y en cierto modo actúa como moneda de cambio para la célula.



APLICACIÓN CLÍNICA 20.1
Obesidad

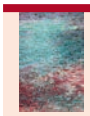
La obesidad es el problema nutricional más frecuente en los Estados Unidos. Produce una disminución de la esperanza de vida ya que es un factor de riesgo en el desarrollo de la diabetes mellitus, hipertensión, carcinoma endometrial, osteoartritis, cirrosis, cálculos biliares y enfermedades cardiovasculares. De hecho, el cuarteto formado por obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión se denomina síndrome X o bien síndrome metabólico y contribuye en gran manera a la alta tasa de muerte cardiovascular en los países occidentales. La obesidad es fácil de explicar: una persona obesa ha ingerido más calorías de las que requería. La acumulación de cantidades masivas de grasa corporal no es posible de otro modo. Por razones desconocidas, el control neurológico de la ingestión calórica para compensar el gasto energético es anormal. En raras ocasiones, la obesidad es una consecuencia secundaria de un desorden corregible, tal como el hipotiroidismo o el síndrome de Cushing. Este último, resultado de unos niveles elevados de glucocorticoides, produce la deposición de grasa en la cara y tronco con desgaste de las extremidades e intolerancia a la glucosa. Estos efectos se deben a un aumento de la degradación de las proteínas musculares y a la conversión de los aminoácidos en glucosa y grasa. Aún más raro es que los tumores, los accidentes vasculares o el maldesarrollo de los centros de control del hambre del sistema nervioso en el hipotálamo provoquen obesidad.

Los modelos genéticos de la obesidad en roedores han abierto nuevos caminos en nuestro conocimiento sobre el control de la masa corporal. El ratón obeso (*ob/ob*) fue descubierto en la década de los 50, y el gen defectivo fue clonado en 1994. El gen *ob* codifica una proteína secretada de 146 aminoácidos (denominada leptina debido a su efecto adelgazante) que se produce en los adipocitos y se detecta en la sangre. Los ratones *ob/ob* tienen una mutación sin sentido en el gen y no producen leptina. La inyección de leptina en ratones *ob/ob* incrementa el consumo energético y reduce la ingestión de alimento, con una pérdida importante de peso. Este efecto sobre el apetito está mimetizado por inyección intracerebroventricular. La leptina también reduce el apetito y peso de los ratones normales. Las personas obesas generalmente no presentan genes *ob* defectivos y, de hecho, tienden a tener niveles sanguíneos de leptina elevados. Esto sugiere que sus sistemas nerviosos son insensibles a la leptina, hecho análogo al de la resistencia a la insulina que se observa en muchos pacientes diabéticos

En el tipo de obesidad más frecuente, el número de adipocitos del cuerpo no aumenta, sino que crecen en tamaño a medidad que se rellenan de triacilgliceroles. No obstante, si aparece la obesidad antes de la pubertad, entonces también puede darse un incremento en el número de adipocitos. En este último caso, tanto la hiperplasia (incremento en el número de células) como la hipertrofia (incremento del tamaño celular) son factores que contribuyen a la magnitud de la obesidad. La obesidad en los varones tiende a centrarse en el abdomen y la grasa mesentérica, mientras que en las mujeres es más probable que sea en las caderas. El patrón masculino, caracterizado por una relación entre la circunferencia de la cintura y de la cadera elevada, es más indicativo de una enfermedad coronaria prematura.

El único tratamiento efectivo de la obesidad es la reducción en la ingestión, o el aumento de la utilización, de calorías. En la práctica esto significa hacer régimen ya que incluso el ejercicio vigoroso, tal como el correr, sólo consume 10 kcal por minuto de ejercicio. Así, después de estar corriendo durante una hora (quizá 8–10 km) se consume la energía contenida en aproximadamente dos barritas de caramelo. No obstante, los programas de ejercicio pueden ser de utilidad para motivar a los individuos a permanecer en su dieta correcta. Desgraciadamente, el cuerpo compensa la disminución en el aporte de energía reduciendo la formación de triyodotironina, lo que comporta la correspondiente disminución del metabolismo basal. En consecuencia, existe una base bioquímica que apoya el hecho reconocido de que es más fácil ganar peso que perderlo. Además, el 95% de la gente que es capaz de perder peso significativamente lo recupera en un año.

Bray, G. D. Effect of caloric restriction on energy expenditure in obese patients. *Lancet* 2:397, 1969; Baringer, M. Obese protein slims mice. *Science* 269:475, 1995; y Ahima, R. S. y Flier, J. S. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62:413, 2000.



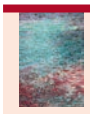
APLICACIÓN CLÍNICA 20.2
Malnutrición proteica

La malnutrición proteica es el problema nutricional más importante y extendido entre los niños en el mundo actual. El síndrome clínico, denominado kwashiorkor, aparece principalmente en niños de 1 a 3 años de edad y se desencadena cuando el lactante se desteta y pasa de la leche materna a una dieta feculenta pobre en proteína. El nombre se originó en Ghana y significa "enfermedad de los niños mayores cuando nace el niño siguiente". Esta enfermedad es la consecuencia de alimentar al niño con una dieta con las calorías adecuadas, pero deficiente en proteínas. El síndrome puede manifestarse clínicamente cuando aumentan las necesidades de proteínas por infecciones, como por ejemplo, malaria, helmintiasis o gastroenteritis. El síndrome se caracteriza por crecimiento reducido, bajos niveles de proteínas y aminoácidos plasmáticos, pérdida de masa muscular, edema, diarrea y una mayor susceptibilidad hacia la infección. La presencia de grasa subcutánea la diferencia claramente de la simple inanición. El mantenimiento de los depósitos de grasa se debe a la ingestión elevada de glúcidos y los elevados niveles de insulina resultantes. De hecho el elevado nivel de insulina interfiere con las adaptaciones descritas para la inanición. No se movilizan las grasas como fuente de energía, no tierne lugar la cetogénesis y no se produce transferencia de aminoácidos desde el músculo esquelético a los órganos internos, es decir, el hígado, riñones, corazón y células del sistema inmunitario. La falta de aminoácidos en la dieta produce una disminución en la síntesis de proteínas en todos los tejidos. El hígado aumenta de tamaño y se infiltra con grasa, lo que refleja la necesidad de síntesis proteica hepática para la formación y liberación de las lipoproteínas de este tejido. La malnutrición proteica desequilibra, además, la función del intestino, lo que da lugar a una malabsorción de las calorías, proteínas y vitaminas, acelerando así la enfermedad. Las consecuencias de la enfermedad dependen de alguna manera del momento en que se produce la deficiencia durante el desarrollo. Los niños con poco peso en relación a la altura se denominan "desgastados", pero pueden experimentar una buena recuperación si se nutren adecuadamente. Aquellos con poca altura en relación al peso se denominan "enanos" y nunca recuperan una altura plena o el potencial cognitivo.

La malnutrición proteica–calórica también es un problema para los ancianos que enferman. Tanto los requerimientos de energía como la ingestión de alimento de los ancianos que gozan de buena salud decae con la edad. Con una dieta baja en calorías, existe el riesgo de que una ingestión insuficiente de proteína y de ciertos nutrientes, tales como el hierro, calcio y vitaminas sea más baja de lo necesario. La deficiencia de estos nutrientes puede acelerar la pérdida de la masa corporal y de la fuerza (lo que da lugar a caídas), la anemia, la pérdida del vigor de los huesos, y, en raras ocasiones, estados de deficiencia vitamínica. Además, las enfemedades crónicas que son más frecuentes en los ancianos a menudo desequilibran el apetito, la ingestión de alimentos o la asimilación de nutrientes. El resultado es que se ha encontrado que los pacientes ancianos sufren más frecuentemente de malnutrición proteica y de calorías que los adultos más jóvenes.

Chase, H. P., Kumar, V., Caldwell, R. T y O'Brien, D. Kwashiorkor in the United States. *Pediatrics* 66:972, 1980; Schlienger, J. L., Pradignac, A. y Grunenberger, F. Nutrition of the elderly: a challenge between facts and needs. *Horm. Res.* 43:46, 1995; Omran, M. L. y Morley, J. E. Assesment of protein energy malnutrition in older persons, part I: history, examination, body composition, and screening tools. *Nutrition* 16:50, 2000; Omran, M. L. y Morley, J. E. Assessment of protein energy malnutrition in older persons, part II: laboratory evaluation. *Nutrition* 16:131, 2000; y Corish, C. A. y Kennedy, N. P. Protein–energy undernutrition in hospital in-patients. *Br. J. Nutr*. 83:575, 2000.

El ser humano tiene la capacidad de consumir alimento en una cantidad muy superior a la requerida por sus necesidades calóricas basales, lo que le permite sobrevivir entre comidas. Así, almacenamos las calorías en forma de glucógeno y triacilglicerol y las consumimos a medida que las necesitamos. Desgraciadamente, la capacidad casi sin límites de consumir alimento se corresponde con una capacidad casi sin límites para almacenarlo en forma de triacilglicerol. La **obesidad**, un problema frecuente en los países desarrollados, es la consecuencia del exceso de consumo de alimentos (Apli. Clín. 20.1), mientras que otras formas de **malnutrición** son más frecuentes en los países subdesarrollados (Aplis. Clíns. 20.2 y 20.3). La re-



APLICACIÓN CLÍNICA 20.3
Inanición

La inanición conduce al desarrollo de un síndrome conocido como marasmo nutricional. Marasmo es una palabra de origen griego que significa "despilfarrar". Aunque no está restringido a ningún grupo de edad, es más frecuente en los niños menores de 1 año de edad. En los países subdesarrollados, el destete temprano de los lactantes es una causa frecuente de marasmo. Esto puede provenir de embarazos en rápida sucesión, del deseo de la madre de volver al trabajo o del paso a fórmulas artificiales excesivamente diluidas con agua (para que duren más y rentabilizar así su elevado coste). Esta práctica conduce a una ingestión insuficiente de calorías. Del mismo modo, puede aparecer diarrea y malabsorción si no se utiliza agua segura y procedimientos de esterilización.

A diferencia del kwashiorkor (Apli. Clín. 20.2), en el marasmo no hay grasa subcutánea, hepatomegalia, ni hígado graso, ya que la grasa se moviliza como fuente de energía y el músculo suministra los aminoácidos necesarios para que el hígado sintetice glucosa y las proteínas hepáticas. Los bajos niveles de insulina presentes permiten al hígado oxidar los ácidos grasos y producir cuerpos cetónicos para otros tejidos. En último término, las reservas energéticas y de proteína se agotan, hasta que el niño muere de inanición. La muerte suele producirse por neumonía, lo cual ocurre porque el niño está demasiado débil para toser. Los adultos pueden padecer marasmo a consecuencia de enfermedades que previenen la deglución (cáncer de garganta o esófago) o interfieren con el acceso al alimento (apoplejía o demencia). Una enfermedad relacionada y muy frecuente es la caquexia por cáncer, la cual se debe, en parte, a la anorexia (pérdida de apetito y, por consiguiente, inanición) y en parte a pérdida de masa corporal. Ésta última difiere de la inanición simple en que no se ahorra el músculo esquelético y porque se usa tanto músculo como grasa para cubrir las necesidades energéticas (véase Apli. Clín. 20.10).

Waterlow, J. C. Childhood malnutrition—the global problem. *Proc. Nutr. Soc.* 38:1, 1979; Uvin, P. The state of world hunger. *Nutr. Rev.* 52:151, 1994; y Body, J. J. The syndrome of anorexia–cachexia. *Curr. Opin. Oncol.* 11:255, 1999.

gulación del consumo de alimento es compleja y no se conoce bien. Un factor importante es la leptina una proteína sintetizada en adipocitos y secretada a la sangre que regula tanto el consumo energético como el apetito a través de los efectos que ejerce en el hipotálamo (véase Apli. Clín. 20.1). El estrecho control necesario se pone de manifiesto mediante el cálculo de que dos porciones extra de mantequilla (~100 cal) por día por encima del consumo calórico produce un aumento de peso de 10 libras (~4,5 kg) por año. Un aumento de peso de 4,5 kilos puede no parecer excesivo, ¡pero multiplicado por 10 años es igual a obesidad!

20.2 CICLO AYUNO–ALIMENTACIÓN

En el estado de buena nutrición, la dieta satisface las demandas energéticas

La Figura 20.2 muestra lo que le sucede a la glucosa, a los aminoácidos y a la grasa obtenidos a partir del alimento. La glucosa pasa desde las células epiteliales del intestino al hígado a través de la vena porta. Antes de pasar a la circulación portal, los aminoácidos son metabolizados parcialmente en el intestino. Los triacilgliceroles, contenidos en los **quilomicrones**, pasan desde las células del epitelio intestinal a la linfa, la cual drena el intestino. Los vasos linfáticos conducen al conducto torácico, el cual, mediante la vena subclavia, distribuye los quilomicrones a la sangre en un sitio de flujo sanguíneo rápido. Esto último permite la rápida distribución de los quilomicrones impidiendo su coalescencia.

El hígado tiene un papel principal en la utilización de la glucosa de la dieta. Puede convertirla en glucógeno mediante la glucogenogénesis, en piruvato y lactato

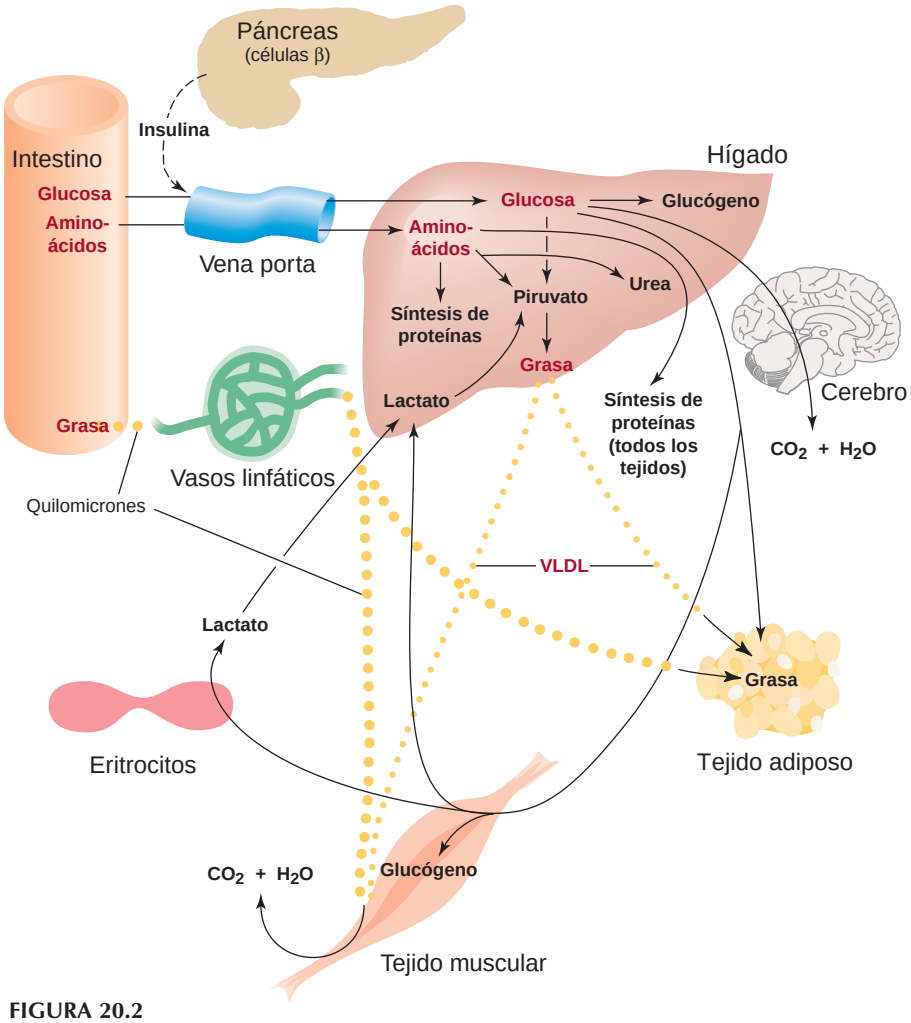


FIGURA 20.2
Utilización de glucosa, aminoácidos y grasa por diversos tejidos en el estado de buena nutrición.

mediante la glucólisis, o ser utilizada en la vía de las pentosas fosfato para la generación de NADPH para los procesos sintéticos. El piruvato se puede oxidar a acetil CoA, el cual, a su vez, se puede convertir en triacilgliceroles o se puede oxidar a CO_2 y agua por el ciclo del TCA. Gran parte de la glucosa que viene del intestino pasa a través del hígado para alcanzar otros órganos como el cerebro y los testículos, que son casi exclusivamente dependientes de glucosa para la producción de ATP, los eritrocitos y la médula renal, que sólo pueden convertir la glucosa en lactato y piruvato, y el tejido adiposo, que la convierte en triacilgliceroles. El músculo también tiene una buena capacidad de utilizar glucosa; la convierte en glucógeno o la introduce en las rutas glucolítica y del ciclo del TCA. A partir de la glucosa circulante, diversos tejidos producen lactato y piruvato que son captados por el hígado y convertidos en triacilgliceroles. En el estado de muy buena nutrición, el hígado utiliza la glucosa y no emplea la gluconeogénesis. Así, el **ciclo de Cori** (conversión de glucosa en lactato en los tejidos periféricos, seguida de la reconversión del lactato en glucosa en el hígado), se interrumpe en el estado de buena nutrición.

Las proteínas de la dieta se hidrolizan en el intestino, cuyas células utilizan parte de los aminoácidos generados como fuente de energía. La mayor parte de los aminoácidos de la dieta se transportan hacia la circulación portal, pero las células del intestino metabolizan el aspartato, la asparagina, el glutamato y la glutamina, y liberan alanina, lactato, citrulina y prolina a la circulación portal. El hígado tiene entonces la oportunidad de eliminar de la sangre los aminoácidos absorbidos (Figura 20.2) pero deja pasar a su través a la mayoría de los aminoácidos, a menos que su concentración sea excepcionalmente elevada. Esto es de una importancia especial en el caso de los aminoácidos esenciales necesarios a todos los tejidos corporales para la síntesis de proteínas. El hígado puede catabolizar aminoácidos, pero los valores de K_m para los aminoácidos de muchos de los enzimas implicados son elevados, y esto permite que se encuentren en exceso antes de que se produzca un catabolismo significativo. Por el contrario, los enzimas cargadores de los tRNA que forman **aminoacil-tRNA** tienen unos valores de K_m para los aminoácidos mucho más bajos. Esto asegura que, en tanto se hallen presentes todos los aminoácidos, pueda tener lugar la síntesis de proteínas necesaria para el crecimiento y para el reemplazo de proteínas. Los aminoácidos en exceso se pueden oxidar completamente a CO_2, urea y agua, o bien los intermediarios pueden utilizarse como sustrato de la lipogénesis. Los aminoácidos no retenidos por el hígado se pueden utilizar para la síntesis de proteína o la obtención de energía en otros tejidos.

La glucosa, el lactato, el piruvato y los aminoácidos se pueden utilizar para mantener la lipogénesis hepática (Figura 20.2). La grasa formada a partir de esos sustratos se libera del hígado en forma de **lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)** mientras que los triacilgliceroles de la dieta se liberan a la sangre en forma de **quilomicrones**. Tanto los quilomicrones como las VLDL circulan por la sangre hasta que actúa sobre ellos un enzima extracelular unido a las células endoteliales de la luz de los capilares de diversos tejidos. Este enzima, la **lipoproteína lipasa**, es especialmente abundante en los capilares del tejido adiposo.

La lipoproteína lipasa libera ácidos grasos por hidrólisis de los triacilgliceroles presentes en las VLDL y en los quilomicrones. Los ácidos grasos son captados por los adipocitos, reesterificados con glicerol 3-fosfato para formar triacilgliceroles y almacenados como gotículas de grasa. El glicerol 3-fosfato se forma a partir de la glucosa, empleando la primera parte de la glucólisis hasta obtener dihidroxiacetona fosfato, la cual, por acción de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, se reduce a glicerol 3-fosfato. La mayor parte de los ácidos grasos presentes en los triacilgliceroles del tejido adiposo humano se originan a partir de ácido grasos llevados a los adipocitos en forma de triacilgliceroles de las VLDL y quilomicrones y no a partir de la síntesis *de novo* de ácidos grasos dentro de los adipocitos.

Las células β del páncreas son muy sensibles en su respuesta al aporte de glucosa y aminoácidos que se produce en el estado de nutrición. Las células β liberan insulina durante la comida y después de ella, lo cual es esencial para el metabolismo de estos nutrientes en el hígado, músculo y tejido adiposo. El papel de la insulina en el ciclo de ayuno–alimentación se tratará más detalladamente en la Sección 20.3.

En el estado temprano de ayuno la glucogenólisis hepática es una importante fuente de glucosa en sangre

La glucogenólisis hepática es muy importante para el mantenimiento de la glucosa sanguínea durante el estado temprano de ayuno (Figura 20.3). La lipogénesis está

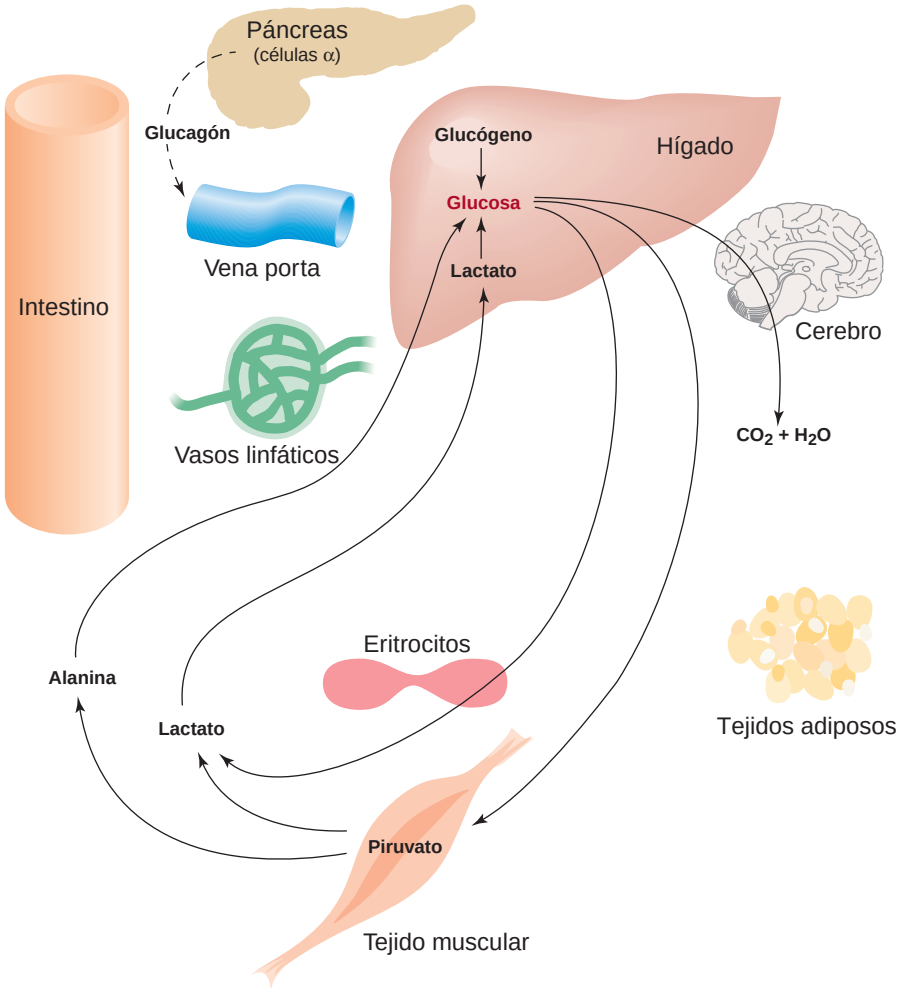


FIGURA 20.3
Interrelaciones metabólicas de los principales tejidos en el estado de ayuno temprano.

restringida, y el lactato, el piruvato y los aminoácidos, que se habían utilizado para mantener este proceso, se desvían hacia la formación de glucosa completando el ciclo de Cori. El **ciclo de la alanina**, en el cual el carbono y el nitrógeno vuelven al hígado en forma de alanina, también se hace cada vez más importante. El catabolismo de los aminoácidos como fuente de energía es muy bajo en la condición de ayuno temprano, dado que hay menos cantidad disponible.

El estado de ayuno requiere gluconeogénesis a partir de aminoácidos y glicerol

Dado que en el estado de ayuno no llega absolutamente nada de combustible del intestino, y queda poco glucógeno en el hígado (Figura 20.4), el cuerpo depende de la **gluconeogénesis** hepática, principalmente a partir de lactato, glicerol y alanina. Los **ciclos de Cori** y de la **alanina** juegan papeles importantes pero no proporcionan carbono para la síntesis neta de glucosa. Esto es así porque la glucosa formada a partir de lactato y alanina por el hígado tan sólo reemplaza a la que se ha convertido en lactato y alanina en los tejidos periféricos. En efecto, estos ciclos transfieren energía a partir de la oxidación de los ácidos grasos en el hígado a los tejidos periféricos que no pueden oxidar triacilgliceroles. El cerebro oxida completamente la glucosa a CO_2 y agua. De ahí que durante el ayuno sea obligatoria la síntesis neta de glucosa a partir de alguna otra fuente de carbono. Los ácidos grasos no se pueden utilizar para la síntesis de glucosa, ya que no existe ninguna ruta por la que el acetil CoA obtenido del catabolismo de los ácidos grasos pueda convertirse en glucosa. El glicerol, un subproducto de la lipólisis en el tejido adiposo, es un sustrato importante para la síntesis de glucosa. Sin embargo, la mayor parte del carbono nece-

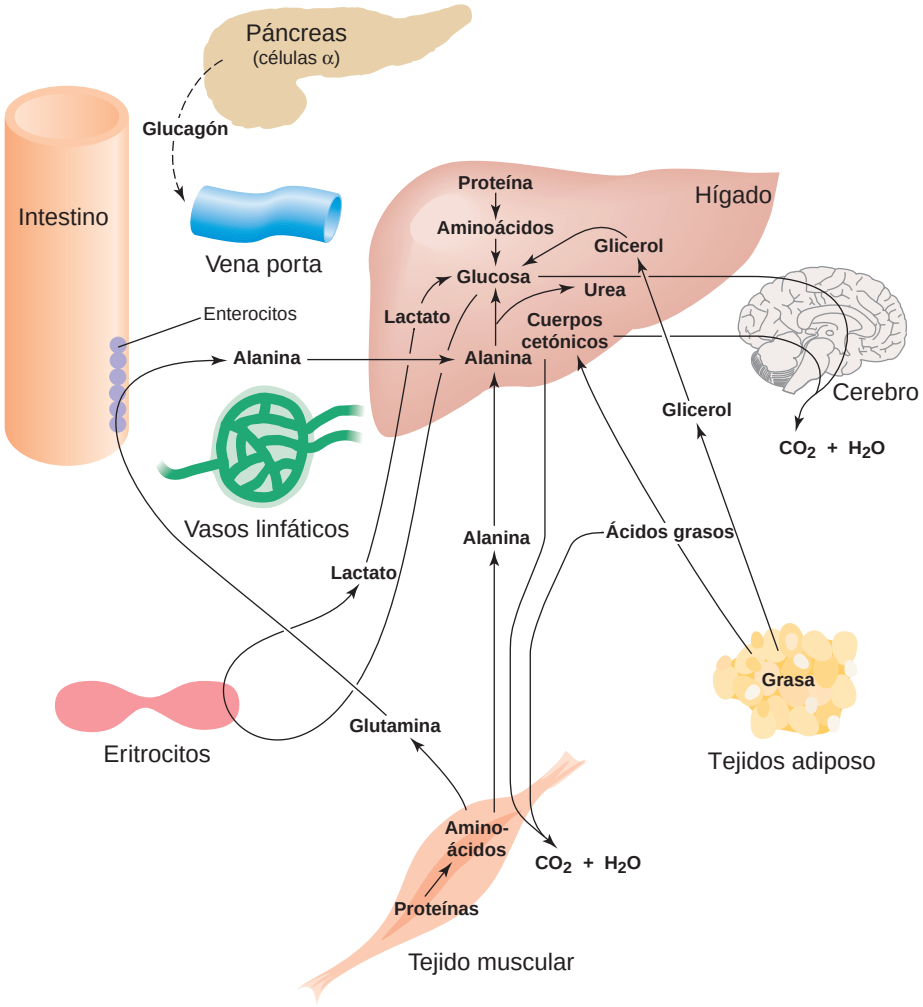


FIGURA 20.4
Interrelaciones metabólicas de los principales tejidos corporales en el estado de ayuno.

sario para la síntesis neta de glucosa proviene de las proteínas, especialmente del músculo esquelético. Las proteínas son hidrolizadas dentro de las células musculares y la mayor parte de los aminoácidos son metabolizados parcialmente. **Alanina** y **glutamina** son los aminoácidos liberados en mayor cantidad. Los otros aminoácidos se metabolizan parcialmente para dar intermediarios (piruvato y α-cetoglutarato), que pueden producir alanina y glutamina. Los aminoácidos de cadena lateral ramificada son una fuente principal de nitrógeno para la producción de alanina y glutamina en el músculo. Los α-cetoácidos de cadena ramificada producidos a partir de los aminoácidos de cadena ramificada por transaminación se liberan parcialmente en la sangre para ser captados por el hígado, que sintetiza glucosa a partir del α-cetoácido de la valina, cuerpos cetónicos a partir del α-cetoácido de la leucina y tanto glucosa como cuerpos cetónicos a partir del α-cetoácido de la isoleucina.

Parte de la glutamina liberada del músculo se convierte en alanina en el epitelio intestinal. La glutamina se oxida parcialmente en los enterocitos, y proporciona energía y moléculas precursoras de las pirimidinas y de las purinas. El carbono y los grupos amino no empleados vuelven a liberarse a la sangre, en parte, en forma de alanina y NH_4^+. Esta ruta, denominada a veces **glutaminólisis** porque la glutamina se oxida sólo parcialmente, implica la formación de malato a partir de la glutamina a través del ciclo de los TCA y la conversión del malato en piruvato por el enzima málico (Figura 20.5*a*). A continuación, el piruvato se transamina con glutamato para dar alanina, que es liberada por las células.

Las células del sistema inmunitario (linfocitos y macrófagos) también utilizan la glutaminólisis para cubrir una gran parte de sus requerimientos energéticos (Figura 20.5*b*). En los linfocitos, el aspartato y no la alanina es el producto final principal de la glutaminólisis. Los enterocitos y los linfocitos utilizan glutamina como

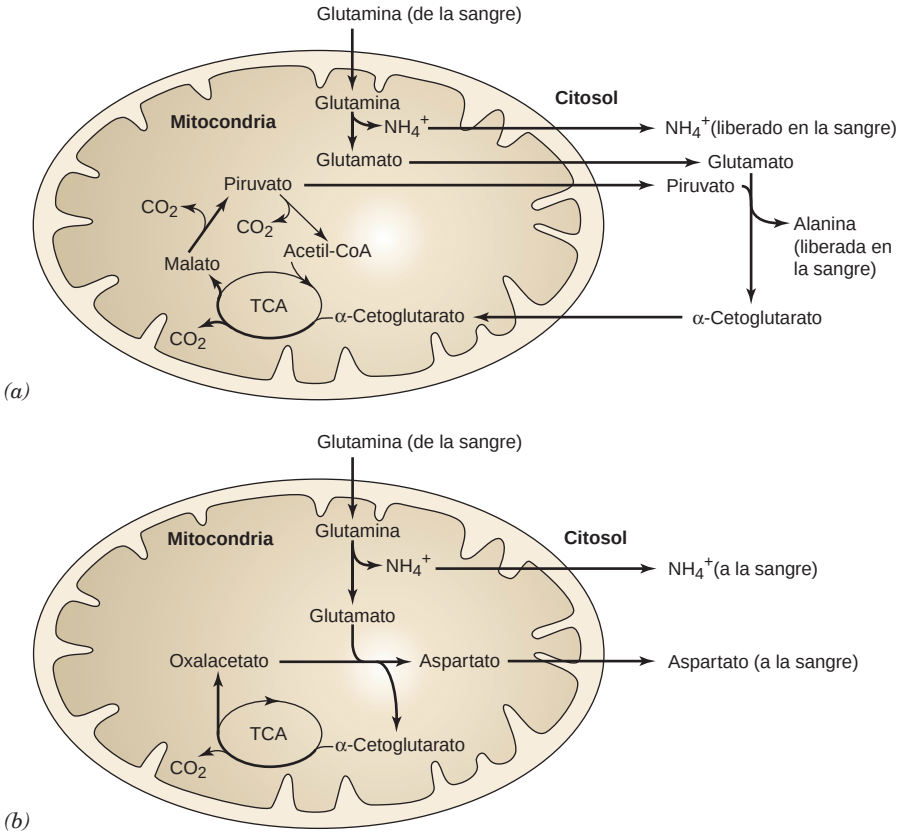


FIGURA 20.5
Catabolismo de la glutamina en las células que se dividen rápidamente.
(*a*) Enterocitos. (*b*) Linfocitos.
Tomado de (a) Duée, P.-H., Darcy-Vrillon, B., Blachier, F. y Morel, M.-T. Proc. Nutr. Soc. *54:83, 1995.*

principal fuente de combustible, asegurándose así el suministro continuo de las moléculas precursoras (glutamina y aspartato) requeridas para la síntesis de purinas y pirimidinas. Estas células, que se dividen rápidamente, las necesitan para la síntesis de RNA y DNA. Desgraciadamente, la glutamina no está incluida en las soluciones para nutrición parenteral.

La síntesis de glucosa en el hígado durante el ayuno está estrechamente relacionada con la síntesis de urea. La mayoría de los aminoácidos pueden perder su nitrógeno amínico por transaminación con α-cetoglutarato, formando glutamato y un nuevo α-cetoácido que, a menudo, puede ser utilizado para la síntesis de glucosa. El glutamato suministra los dos compuestos nitrogenados necesarios para la síntesis de urea: amoníaco, por desaminación oxidativa mediante la glutamato deshidrogenasa, y aspartato, por transaminación del oxalacetato mediante la aspartato aminotransferasa. Una fuente adicional importante de amoníaco y de precursores de la ornitina tales como la citrulina es la mucosa intestinal (se describe más detalladamente en la Sección 20.4).

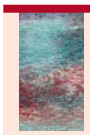
El **tejido adiposo** es también muy importante en el estado de ayuno. Debido a la baja proporción de insulina en sangre durante el ayuno, la **lipólisis** está muy activada en este tejido. Esto incrementa los niveles de ácidos grasos en la sangre, que pueden ser utilizados por muchos tejidos como combustibles alternativos a la glucosa. En el corazón y el músculo, la oxidación de los ácidos grasos inhibe la glucólisis y la oxidación del piruvato. En el hígado, los ácidos grasos proporcionan la mayor parte del ATP necesario para la gluconeogénesis. Muy poco acetil CoA generado por la oxidación de los ácidos grasos en el hígado se oxida completamente. En estas condiciones, el acetil CoA es convertido en cuerpos cetónicos por las mitocondrias hepáticas. Los **cuerpos cetónicos** (acetoacetato y β-hidroxibutirato) se liberan a la sangre para ser usados como fuente de energía por muchos tejidos. Al igual que sucede con los ácidos grasos, muchos tejidos prefieren los cuerpos cetónicos a la glucosa. El cerebro no oxida los ácidos grasos, ya que estos compuestos no atraviesan la barrera hematoen-

cefálica. Una vez que la concentración en la sangre es suficientemente elevada, los cuerpos cetónicos pueden entrar en el cerebro y son un buen combustible alternativo. Son incapaces, sin embargo, de reemplazar completamente las necesidades de glucosa que tiene el cerebro. Los cuerpos cetónicos pueden suprimir también la proteólisis y la oxidación de aminoácidos de cadena ramificada en el músculo y disminuyen la liberación de alanina. Ello contribuye tanto a disminuir la pérdida de masa muscular como a reducir la cantidad de glucosa sintetizada en el hígado. Mientras los niveles de cuerpos cetónicos son mantenidos a valores elevados por la oxidación hepática de los ácidos grasos existe menos necesidad de glucosa, menos necesidad de aminoácidos gluconeogénicos, y menos necesidad de utilizar precioso tejido muscular.

En la Figura 20.4 se muestran las relaciones entre hígado, músculo y tejido adiposo en cuanto al suministro de glucosa al cerebro. El hígado sintetiza la glucosa, el músculo y el intestino suministran el sustrato (alanina) y el tejido adiposo suministra el ATP (vía oxidación de ácidos grasos en el hígado) necesarios para la gluconeogénesis hepática. Estas interrelaciones están interrumpidas en el **síndrome de Reye** (Apli. Clín. 20.4), así como por la ingestión de alcohol (Apli. Clín. 14.10). Esta cooperación entre tejidos es dependiente de los niveles apropiados de hormonas en sangre. Los niveles de glucosa son menores en el estado de ayuno, lo que reduce la liberación de insulina y favorece la liberación de glucagón del páncreas y de **adrenalina** de la médula suprarrenal. Además, el ayuno reduce la formación de **triyodotironina**, forma activa de la hormona tiroidea, a partir de la **tiroxina**. Esto reduce el requerimiento diario basal de energía en un 25%. Esta respuesta resulta útil para la supervivencia pero hace que la pérdida de peso sea más difícil que la ganancia de peso (véase Apli. Clín. 20.1).

En el estado temprano de renutrición las grasas se metabolizan normalmente, pero el metabolismo normal de la glucosa se restablece lentamente

La Figura 20.6 muestra qué es lo que ocurre inmediatamente después de la absorción de nutrientes procedentes del intestino. Los triacilgliceroles se metabolizan tal como se describió para el estado de buena nutrición. Por el contrario, el hígado absorbe poca glucosa y, de hecho, el hígado continúa en estado gluconeogénico todavía algunas horas después de la comida. Sin embargo, la gluconeogénesis hepática no produce glucosa sanguínea, sino glucosa 6-fosfato para la glucogenogénesis.



APLICACIÓN CLÍNICA 20.4
Síndrome de Reye

El síndrome de Reye es una devastadora, aunque actualmente rara, enfermedad infantil que se caracteriza por una evidente disfunción cerebral y edema (irritabilidad, letargia, coma) y por disfunción hepática (abundantes ácidos grasos libres en el plasma, hígado graso, hipoglucemia, hiperamonemia y acumulación de ácidos orgánicos de cadena corta). Parece ser que las mitocondrias hepáticas están dañadas específicamente, lo cual impide la oxidación de los ácidos grasos y la síntesis de carbamil fosfato y ornitina (para la destoxificación amónica) y oxalacetato (para la gluconeogénesis). Por otro lado, la acumulación de ácidos orgánicos ha hecho pensar que la oxidación de estos compuestos es defectuosa y que los ésteres de CoA de alguno de estos ácidos podrían inhibir determinados enzimas, tales como la carbamil fosfato sintetasa I, piruvato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa y el transportador de nucleótidos de adenina, todas ellas presentes en la mitocondria. Esta cuestión no se ha resuelto todavía. La administración de aspirina a niños con varicela se ha relacionado con el desarrollo del síndrome de Reye, por lo cual se aconseja a los padres no suministrar aspirina a niños con infecciones víricas. En consecuencia, ha disminuido la incidencia del síndrome. La terapia contra el síndrome de Reye consiste en medidas para reducir el edema cerebral y la provisión intravenosa de glucosa. La administración de glucosa previene la hipoglucemia y provoca un aumento en los niveles de insulina, lo cual puede (1) inhibir la lipólisis en las células del tejido adiposo y (2) reducir la proteólisis y la liberación de aminoácidos en el músculo, lo cual (3) disminuiría la desaminación de los aminoácidos para producir amoníaco. Aunque el síndrome de Reye es ahora raro, en años recientes se han reconocido otros síndromes relacionados con la lesión de las mitocondrias de los hepatocitos. Entre estos se cuentan la toxicidad de un fármaco experimental para la hepatitis (fialuridina) y varios análogos de nucleósidos con propiedades antirretrovíricas. La lesión de las mitocondrias produce acidosis láctica, hipoglucemia y acumulación de grasa en el hígado que, en algunos casos, finaliza en fallo hepático. Parece que estos agentes interfieren con la síntesis de DNA mitocondrial, con acumulación de mutaciones en proteínas y RNA clave codificados por las mitocondrias.

Reye, R. D. K., Morgan, G. y Baval, J. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera, a disease entity in childhood. *Lancet* 2:749, 1963; Treem, W. R. Inherited and acquired syndromes of hyperammonemia and encephalopathy in children. *Semin. Liver Dis.* 14:236, 1994; y Semino-Mora, C., Leon-Monzon, M. y Dalakas, M. C. Mitochondrial and cellular toxicity induced by fialuridine in human muscle *in vitro*. *Lab. Invest.* 76:487, 1997.

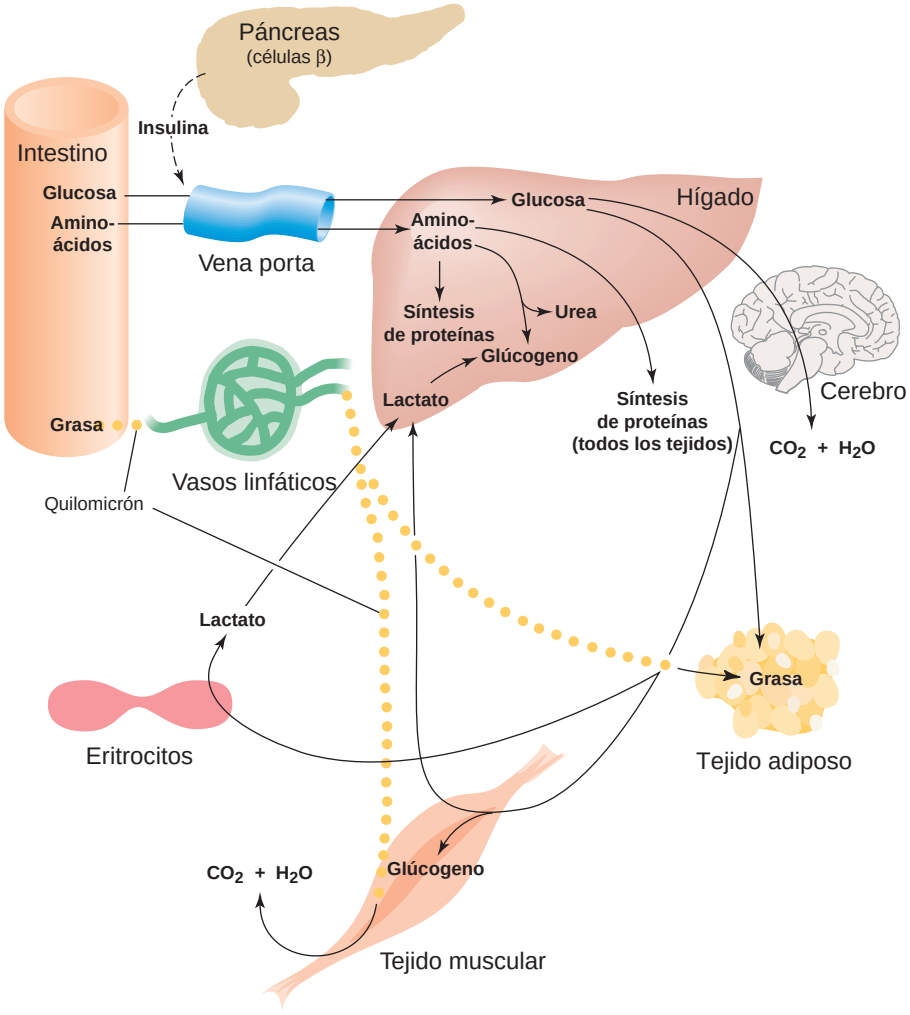
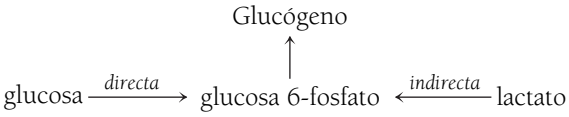


FIGURA 20.6
Interrelaciones metabólicas de los principales tejidos en el estado temprano de renutrición.

Esto significa que, después del ayuno, el glucógeno hepático no se repone por síntesis directa a partir de la glucosa de la sangre. Lo que ocurre en lugar de esto es que los tejidos periféricos catabolizan la glucosa a lactato, el cual se convierte en el hígado en glucógeno mediante la *ruta indirecta de síntesis de glucógeno* (a saber, la gluconeogénesis):



La gluconeogénesis a partir de aminoácidos específicos provenientes del intestino también desempeña un importante papel en el restablecimiento de los niveles normales de glucógeno hepático por la ruta indirecta. Después de disminuir la velocidad de la gluconeogénesis, la glucólisis se convierte en el hígado en el principal proceso de utilización de glucosa y el glucógeno hepático se mantiene por la *ruta directa de síntesis* a partir de la glucosa sanguínea.

Otras importantes interacciones metabólicas entre órganos

En el epitelio intestinal existe otra importante ruta para la conversión de glutamina a **citrulina** (Figura 20.7). Uno de los enzimas (la glutamato reductasa dependiente de ATP) necesario para esta conversión se expresa solamente en los enterocitos. La citrulina producida en el intestino es metabolizada por el riñón a arginina, que a su

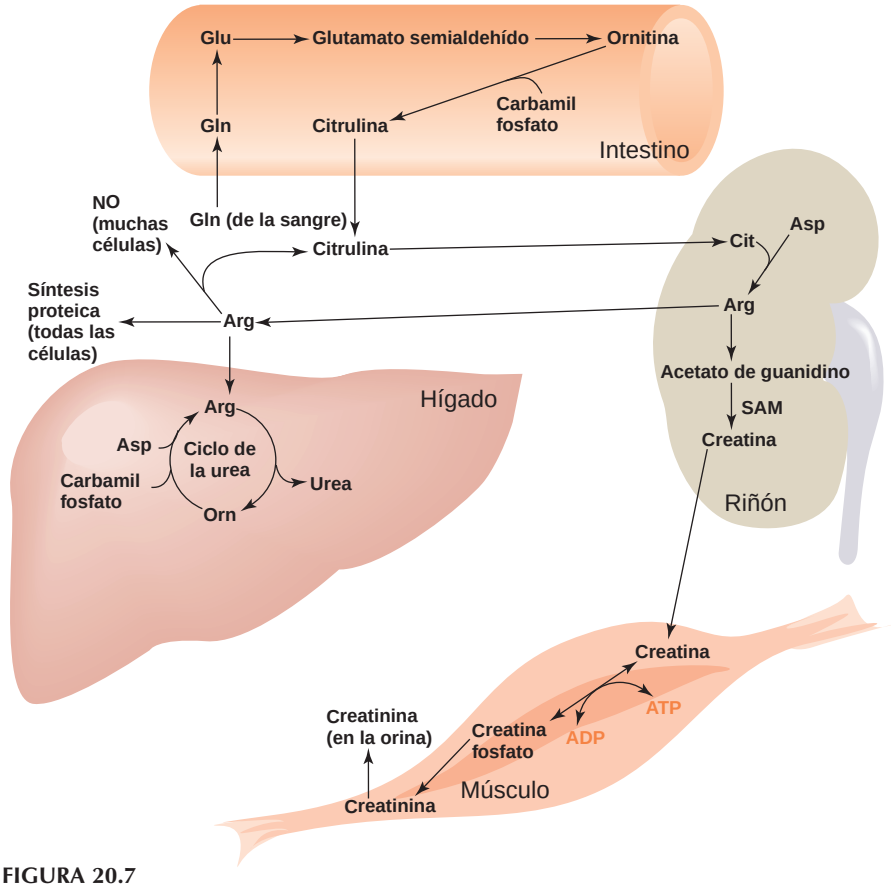


FIGURA 20.7
El intestino y el riñón funcionan juntos en la síntesis de la arginina a partir de la glutamina.
Abreviaturas: Cit, citrulina; Arg, arginina; Asp, aspartato; Gln, glutamina; Glu, glutamato; NO, óxido nítrico; Orn, ornitina; SAM, S-adenosilmetionina.

vez puede ser convertida en creatina o liberada en la sangre. El hígado utiliza la arginina sanguínea para producir ornitina, que aumenta la capacidad del **ciclo de la urea** durante períodos de incorporación creciente de proteínas. Aunque no resulte quizás obvio de entrada, esta ruta tiene gran importancia para la actividad del ciclo de la urea en el hígado.

El hígado contiene un sistema enzimático que convierte irreversiblemente la ornitina en glutamato:

$$\text{Ornitina} \rightarrow \text{glutamato semialdehído} \rightarrow \text{glutamato}$$

La desaparición de ornitina por estas reacciones inhibe la síntesis de urea en el hígado por falta de ornitina, el intermediario del ciclo de la urea que se ha de reciclar. La restitución de ornitina es necesaria y completamente dependiente de una fuente de arginina sanguínea. Así, la síntesis de urea en el hígado depende de la síntesis de citrulina por el intestino y de la síntesis de arginina por el riñón. Muchas células también utilizan arginina para la producción de **óxido nítrico (NO)** (Figura 20.7), un activador de la guanilato ciclasa que produce cGMP, un importante segundo mensajero (véase p. 950).

La citrulina participa en otra interesante lanzadera entre órganos (interorgánica). La arginina generada a partir de la citrulina en el riñón puede ser metabolizada posteriormente a **creatina** (Figura 20.7). El primer enzima de esta ruta es la glicina transamidinasa (GTA), que genera acetato de guanidinio a partir de arginina y de glicina (véase p. 818). La GTA se encuentra predominantemente en la corteza renal, el páncreas y el hígado. Por metilación, en una reacción que requiere ***S*-adenosilmetionina** (SAM), se forma creatina. Este es el uso cuantitativamente más importante de la SAM en el organismo; se sintetizan de uno a dos gramos de creatina por día. A continuación, la creatina circula hasta otros tejidos y se acumula en el músculo en donde, una vez fosforilada a **fosfato de creatina**, se utiliza como re-

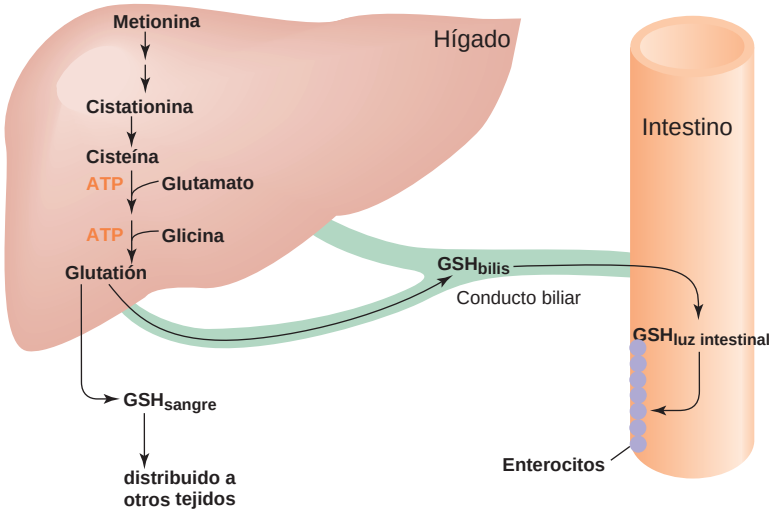


FIGURA 20.8
El hígado proporciona el glutatión para otros tejidos.

serva rica en energía. El fosfato de creatina es convertido no enzimáticamente en creatinina, que se libera al torrente sanguíneo y se elimina del cuerpo por filtración renal. De este modo, la excreción de creatinina se utiliza como una medida tanto de la masa muscular como de la función renal.

Otros dos compuestos relacionados con aminoácidos participan en las lanzaderas entre órganos. El **glutatión (GSH)** es un tripéptido importante para la destoxificación de peróxidos generados endógenamente y de compuestos químicos exógenos (véase p. 818). El hígado juega un papel principal en la síntesis de GSH a partir de glutamato, cisteína y glicina (Figura 20.8). Esta síntesis está limitada por la disponibilidad de cisteína. La cisteína presente en el plasma no es incorporada eficientemente por el hígado, que utiliza metionina procedente de la dieta para formar cisteína a través de la ruta de la cistationina (véase p. 803). El GSH hepático se libera tanto al torrente sanguíneo como a la bilis. El riñón elimina una cantidad considerable del GSH plasmático. Los enterocitos pueden incorporar el GSH excretado por la bilis desde la luz intestinal. La liberación en el plasma se produce tanto en el estado de nutrición como en el de ayuno, proporcionando una fuente estable de este compuesto y de los aminoácidos que lo componen, especialmente cisteína, para la mayor parte de los tejidos del cuerpo.

La **carnitina** se genera a partir de residuos lisilo de diversas proteínas, los cuales son *N*-metilados mediante SAM para formar residuos de trimetil-lisilo (Figura 20.9). Se libera **trimetil-lisina** cuando las proteínas son degradadas. La trimetil-lisina es hidroxilada y a continuación partida, liberándose glicina y γ-butirobetaína aldehído. Este último es oxidado a γ-butirobetaína y a continuación hidroxilado para formar carnitina. Los dos pasos de hidroxilación requieren **vitamina C** como cofactor. El riñón y, en menor medida, el hígado son los únicos tejidos que pueden llevar a cabo la ruta completa y, de este modo, suministran a los otros tejidos, especialmente músculo y corazón, la carnitina necesaria para la oxidación de los ácidos grasos. El músculo esquelético puede formar γ-butirobetaína, pero ha de liberarla para su conversión final a carnitina por el hígado o el riñón.

Necesidades energéticas, reservas y homeostasis calórica

Una persona media que lleve una vida sedentaria consume diariamente unos 180–280 g de glúcidos, 70–100 g de proteína y 70–100 g de grasa. Estas cantidades corresponderían a un requerimiento de energía diario de 1600–2400 kcal. Tal como se muestra en la Tabla 20.1, las **reservas energéticas** de una persona media son considerables. Estas reservas son movilizadas entre las comidas y durante la noche para mantener la glucosa sanguínea. Aunque la capacidad de movilizar rápidamente el glucógeno sea verdaderamente muy importante, nuestras reservas de glucógeno son minúsculas con respecto a nuestras reservas de grasa (Tabla 20.1). Los

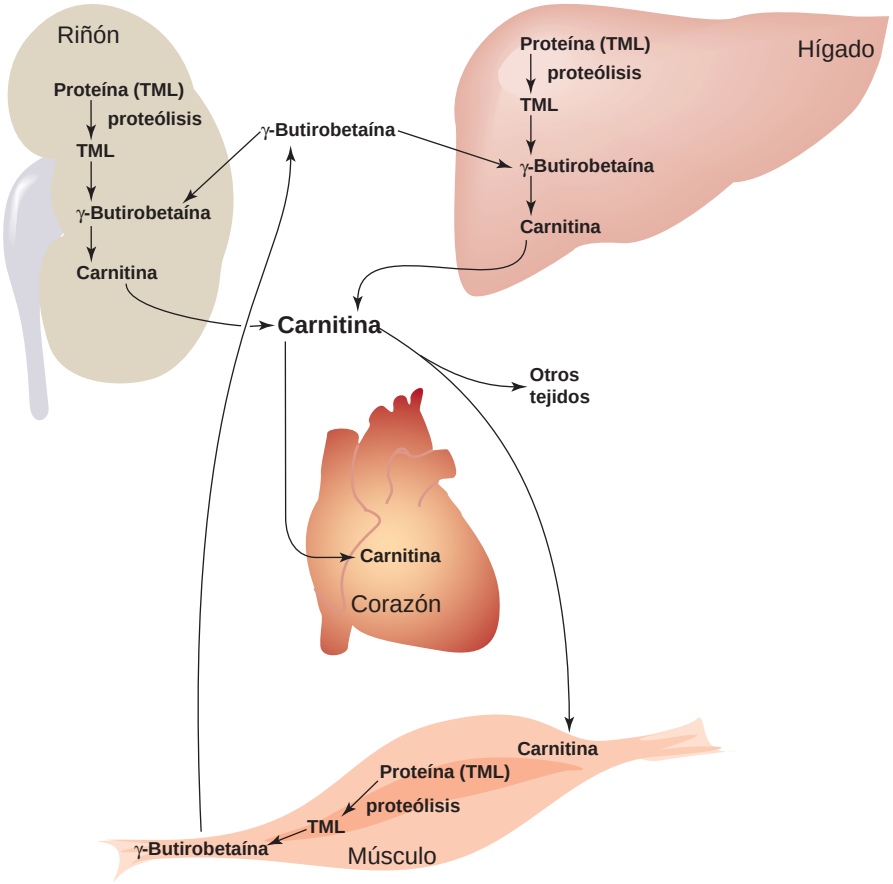


FIGURA 20.9
El riñon y el hígado proporcionan la carnitina para otros tejidos.
Abreviaturas: (TML), residuos trimetil-lisilo en moléculas de proteína; TML, trimetil-lisina libre.

depósitos de grasa se movilizan sólo durante estados de ayuno más prolongados. Los depósitos de grasa de los sujetos obesos pueden llegar a pesar 80 kg, con lo que añaden 585 000 kcal más a sus reservas energéticas. En la Tabla 20.1 se incluye la proteína como reserva energética ya que se puede utilizar para proporcionar aminoácidos para ser oxidados. Por otro lado, a diferencia del glucógeno y de los triacilgliceroles almacenados, la proteína no es inerte. Las proteínas forman los músculos que nos permiten movernos y respirar y los enzimas que llevan a cabo nuestro metabolismo. De ahí que no se pueda prescindir de ella como sí se puede hacer con los triacilgliceroles y el glucógeno, y que sea cedida por el cuerpo de forma tan reacia.

TABLA 20.1 Reservas energéticas del ser humano[a]

		Reservas de combustibles	
Combustible almacenado	*Tejido*	*(g)*	*(kcal)*
Glucógeno	Hepático	70	280
Glucógeno	Muscular	120	480
Glucosa	Fluidos corporales	20	80
Grasa	Adiposo	15 000	135 000
Proteína	Muscular	6000	24 000

[a]Los datos son para sujetos normales de 70 kg de peso. Se calcula que los glúcidos contienen 4 kcal g^{-1}; las grasas 9 kcal g^{-1} y las proteínas 4 kcal g1^{-1}.

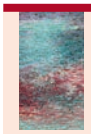
TABLA 20.2 Niveles de sustrato y de hormonas en la sangre de una persona bien nutrida, en ayuno y en inanición[a]

Hormona o sustrato (unidades)	*Muy bien alimentado*	*Después de la absorción 12 h*	*Ayuno de 3 días*	*Inanición de 5 semanas*
Insulina (μU mL^{-1})	40	15	8	6
Glucagón (pg mL^{-1})	80	100	150	120
Proporción insulina/glucagón (μU pg^{-1})	0,50	0,15	0,05	0,05
Glucosa (mM)	6,1	4,8	3,8	3,6
Ácidos grasos (mM)	0,14	0,6	1,2	1,4
Acetoacetato (mM)	0,04	0,05	0,4	1,3
β-Hidroxibutirato (mM)	0,03	0,10	1,4	6,0
Lactato (mM)	2,5	0,7	0,7	0,6
Piruvato (mM)	0,25	0,06	0,04	0,03
Alanina (mM)	0,8	0,3	0,3	0,1
Equivalentes de ATP (mM)	313	290	380	537

Fuente: N. B. Ruderman, T. T. Aoki y G. F. Cahill, Jr. Gluconeogenesis and its disorders in man, en R. W. Hanson y M. A. Mehlman (Eds.), *Gluconeogenesis, its regulation in mammalian Species*. New York: Wiley, 1976, p. 515.

[a]Datos para sujetos de peso normal excepto en los valores de inanición a las 5 semanas, que están calculados a partir de sujetos obesos sometidos a inanición terapéutica. Los equivalentes de ATP se calcularon sobre la base del rendimiento de ATP esperado para la oxidación completa para cada sustrato a CO_2 y H_2O: 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa; 144 para el ácido graso medio (oleato); 23 para el acetoacetato; 26 para el β-hidroxibutirato; 18 para el lactato; 15 para el piruvato y 13 (corregido por la formación de urea) para la alanina.

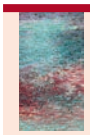
La disponibilidad constante de combustibles en la sangre se denomina **homeostasis calórica**, la cual implica que, tal como se ilustra en la Tabla 20.2, e independientemente de si la persona se encuentra en un estado de buena nutrición, en ayuno, o muriendo de inanición, el nivel sanguíneo de combustible en equivalentes de ATP no cae por debajo de cierto límite. Obsérvese que los niveles de glucosa sanguínea están controlados dentro de límites muy estrechos, mientras que las concentraciones de ácidos grasos en la sangre pueden variar en un orden de magnitud, y los cuerpos cetónicos en dos órdenes de magnitud. La glucosa está cuidadosamente regulada debido a la absoluta necesidad que de este sustrato tiene el cerebro. Si el nivel de glucosa sanguínea desciende demasiado (<1,5 mM), se produce el coma, a lo que sigue la muerte al poco tiempo, a menos que se corrija la concentración de glucosa. Por otro lado, debe evitarse la **hiperglucemia**, debido a que la glucosa se perdería por la orina que daría como resultado la deshidratación y, a veces, coma hiperosmolar hiperglucémico (Apli. Clín. 20.5). La hiperglucemia crónica



APLICACIÓN CLÍNICA 20.5
Coma hiperosmolar hiperglucémico

Los pacientes de diabetes de tipo II desarrollan a veces una condición denominada coma hiperosmolar hiperglucémico. Esto es particularmente habitual en la vejez pero también puede producirse en individuos bajo estrés metabólico grave sin antecedentes de diabetes. La hiperglucemia, quizá empeorada por la no administración de insulina o fármacos hipoglucemiantes, infección o la coincidencia de un problema médico como un ataque al corazón, conduce a la pérdida urinaria de agua, glucosa y electrolitos (sodio, cloruro y potasio). Esta diuresis osmótica reduce el volumen de sangre circulante, situación de estrés que da lugar a la liberación de hormonas que agravan la resistencia a la insulina y la hiperglucemia. Además, los pacientes ancianos pueden sentir menos la sensación de sed incorporando menos líquidos. Al cabo de varios días estos pacientes pueden llegar a ser extremadamente hiperglucémicos (glucosa > 1000 mg dL^{-1}), deshidratarse y entrar en coma. En estos pacientes no se desarrolla una cetoacidosis, probablemente debido a que los niveles de ácidos grasos libres no son siempre elevados o a que las concentraciones de insulina en la sangre portal son las adecuadas para inhibir la cetogénesis (aunque no lo suficientemente elevadas para inhibir la gluconeogénesis). La terapia se encamina a reponer el equilibrio de agua y electrolitos y a corregir la hiperglucemia con insulina. La mortalidad de este síndrome es considerablemente mayor que la de la cetoacidosis diabética.

Arieff, A. I. y Carroll, H. J. Nonketotic hyperosmolar coma with hyperglycemia. Clinical features, pathophysiology, renal function, acid–base balance, plasma–cerebrospinal fluid equilibria, and the effects of therapy in 37 cases. *Medicine* 51:73, 1972; Genuth, S. M. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar coma. *Curr. Ther. Endocrinol. Metab.* 6:438, 1997; y Lorber, D. Nonketotic hypertonicity in diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* 79:39, 1995.



APLICACIÓN CLÍNICA 20.6
Hiperglucemia y glucosilación de proteínas

Se sabe que la glucosilación de los enzimas produce cambios en su actividad, solubilidad y susceptibilidad a la degradación. En el caso de la hemoglobina A, la glucosilación tiene lugar mediante una reacción no enzimática entre la glucosa y la valina amino terminal de la cadena β. Se forma una base de Schiff entre la glucosa y la valina, proceso seguido por un reordenamiento de la molécula que da una molécula de 1-desoxifructosa unida a la valina. La reacción está favorecida por niveles elevados de glucosa, y la proteína resultante, denominada hemoglobina A_{1c}, es un buen índice para conocer la concentración promedio de glucosa en la sangre de una persona durante las semanas anteriores. La concentración de esta proteína modificada aumenta en un diabético incontrolado, y disminuye en aquellos pacientes que controlan la glucosa estrictamente.

Se ha propuesto que la glucosilación de las proteínas puede contribuir a las complicaciones médicas causadas por la diabetes, por ejemplo enfermedad cardíaca coronaria, retinopatía, nefropatía, cataratas y neuropatía. La mayor glucosilación de las proteínas del cristalino puede contribuir al desarrollo de cataratas de origen diabético. El colágeno, la laminina, la vitronectina y otras proteínas de la matríz pueden ser glucosiladas y sufrir alteraciones en sus propiedades biológicas, tales como el autoensamblaje y la unión de otras moléculas de la matríz. Las proteínas y lipoproteínas glucosiladas también pueden ser reconocidas por los receptores presentes en los macrófagos, los cuales están íntimamente implicados en la formación de placas ateroscleróticas. Es probable que estos cambios aceleren la aterosclerosis característica de los diabéticos. El compuesto aminoguanidina inhibe la formación de los productos de glucosilación y se está comprobando su capacidad de prevenir las complicaciones de la diabetes.

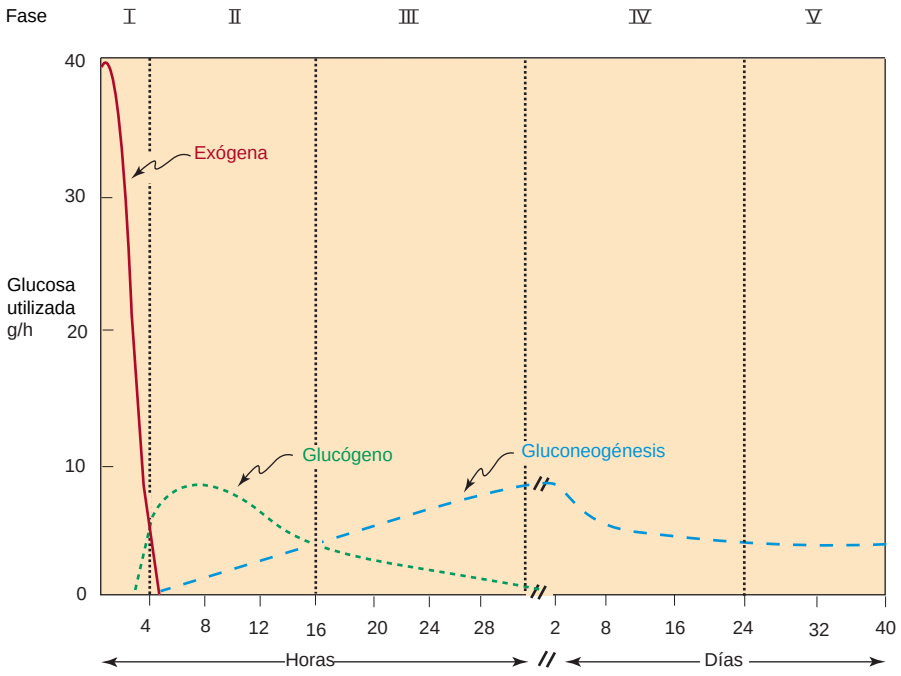
Brownlee, M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 15:1835, 1992; Ceriello, A. Hyperglycemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutr. Metab.* 12:42, 1999; y Schmidt, A. M., Yan, S. D., Wautier, J. L. y Stern, D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ. Res.* 84:489, 1999.

da lugar a la glucosilación de una serie de proteínas, lo que contribuye a las complicaciones de la **diabetes** (Apli. Clín. 20.6). Los cambios en la **proporción insulina/glucagón** que se muestran en la Tabla 20.2, son cruciales para el mantenimiento de la homeostasis calórica. Dicho de forma simple, en los individuos bien nutridos la proporción insulina/glucagón es elevada, lo que favorece el almacenamiento de glucógeno y triacilgliceroles, mientras que esta proporción es baja en los individuos en estado de inanición, lo que estimula la glucogenólisis, la lipólisis, la cetogénesis, la proteólisis y la gluconeogénesis.

La homeostasis de la glucosa tiene cinco fases

La Figura 20.10 está tomada del trabajo de Cahill y de sus colaboradores con pacientes obesos sometidos a inanición a largo plazo para perder peso. Ilustra los efectos de la inanición sobre los procesos utilizados para mantener la **homeostasis de la glucosa** y se divide arbtrariamente en cinco fases. La fase I es el estado de buena nutrición en el que la glucosa proviene de los glúcidos de la dieta. Una vez agotado este suministro, la glucogenólisis hepática mantiene los niveles de glucosa sanguínea durante la fase II. A medida que este suministro de glucosa empieza a disminuir, la gluconeogénesis hepática a partir del lactato, glicerol y alanina se hace cada vez más importante, hasta que, en la fase III, constituye la principal fuente de glucosa sanguínea. Estos cambios tienen lugar dentro de las 20 horas, aproximadamente, de ayuno, dependiendo de lo bien nutrido que estuviese el individuo con anterioridad al ayuno, de la cantidad de glucógeno hepático presente y de la clase de actividad física realizada durante el ayuno. Varios días de ayuno conducen a la fase IV, en la que, de hecho, disminuye la dependencia respecto a la gluconeogénesis. Como ya se ha tratado anteriormente, los cuerpos cetónicos se han acumulado en concentraciones que son suficientemente elevadas para poder penetrar en el cerebro y satisfacer algunas de sus necesidades energéticas. En esta fase, la gluconeogénesis renal también experimenta un aumento significativo. La fase V aparece después de inanición muy prolongada de individuos extremadamente obesos y se caracteriza por una dependencia todavía menor con respecto a la gluconeogénesis. En esta fase, las necesidades energéticas de prácticamente todos los tejidos son satisfechas en una gran proporción por la oxidación de ácidos grasos o cuerpos cetónicos.

Mientras las concentraciones de los cuerpos cetónicos sean elevadas, la proteólisis estará algo restringida, consiguiéndose así la conservación de las proteínas musculares y de los enzimas. Esto continúa así hasta que prácticamente toda la grasa ha desaparecido como consecuencia de la inanición. Después de que ha desaparecido la totalidad de la misma, el cuerpo ha de utilizar la proteína muscular. Antes de que ésta haya desaparecido totalmente, uno se ha muerto (Apli. Clín. 20.3).



Fase	ORIGEN DE LA GLUCOSA SANGUÍNEA	TEJIDOS QUE UTILIZAN GLUCOSA	PRINCIPAL COMBUSTIBLE DEL CEREBRO
I	Exógeno	Todos	Glucosa
II	Glucógeno Gluconeogénesis hepática	Todos excepto el hígado. El músculo y el tejido adiposo en pequeña proporción	Glucosa
III	Gluconeogénesis hepática Glucógeno	Todos excepto el hígado. El músculo y el tejido adiposo en proporciones intermedias entre II y IV	Glucosa
IV	Gluconeogénesis hepática y renal	Cerebro, eritrocitos, médula renal. El músculo en pequeña cantidad	Glucosa, cuerpos cetónicos
V	Gluconeogénesis hepática y renal	El cerebro en pequeña proporción, eritrocitos, médula renal	Cuerpos cetónicos, glucosa

FIGURA 20.10
Las cinco fases de la homeostasis de la glucosa en el ser humano.
De Ruderman, N. B., Aoki, T. T. y Cahill, G. F. Jr. En: R. W. Hanson y M. A. Mehlman (Eds.), Gluconeogenesis, Its Regulation in Mammalian Species. *New York: Wiley, 1976, p. 515.* Reproducido con permiso.

20.3 MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CONMUTACIÓN DEL METABOLISMO HEPÁTICO ENTRE LOS ESTADOS DE BUENA NUTRICIÓN Y DE INANICIÓN

El hígado de una persona bien nutrida se dedica de forma activa a procesos que favorecen la síntesis de glucógeno y de triacilgliceroles; un hígado de este tipo es **glucogenogénico**, **glucolítico** y **lipogénico**. El hígado de un individuo en ayunas es un órgano totalmente diferente, pues es **glucogenolítico**, **gluconeogénico**, **cetogénico** y **proteolítico**. La estrategia consiste en almacenar calorías cuando hay ali-

mento, pero al mismo tiempo ser capaz de movilizar estos depósitos cuando el resto del cuerpo está necesitado. El hígado conmuta entre estos extremos metabólicos mediante varios mecanismos de regulación: suministro de sustratos, efectores alostéricos, modificación covalente e inducción–represión de enzimas.

La disponibilidad de sustrato controla muchas rutas metabólicas

Debido a otros niveles de control más precisos, se tiende a ignorar frecuentemente la importancia del **suministro de sustratos**. Sin embargo, la concentración de ácidos grasos en la sangre que entra en el hígado es claramente un determinante principal de la velocidad de la cetogénesis. No se sintetiza un exceso de triacilgliceroles a menos que se consuman cantidades excesivas de aquellos sustratos que se pueden utilizar para el proceso de la lipogénesis. La síntesis de glucosa en el hígado también se encuentra restringida por la velocidad con la que los sustratos gluconeogénicos alcanzan el hígado. La liberación excesiva de aminoácidos hacia el hígado de las personas diabéticas, a causa de la proteólisis rápida e incontrolada, incrementa la velocidad de la gluconeogénesis y agrava la hiperglucemia característica de la diabetes. Además, los niveles elevados de glucosa aumentan la velocidad de síntesis de sorbitol, que puede contribuir a complicaciones de la diabetes. Por otro lado, la incapacidad de suministrar al hígado las cantidades adecuadas de sustratos glucogénicos (principalmente alanina) explicaría algunos tipos de hipoglucemia, tales como las que se observan durante el embarazo o en la desnutrición avanzada.

Otra ruta que puede estar regulada por el suministro de sustratos es la **síntesis de urea**. El metabolismo de los aminoácidos en el intestino proporciona una fracción importante del amoníaco que utiliza el hígado para la producción de urea. Como se ha tratado anteriormente, el intestino también libera citrulina, precursor metabólico de la ornitina. Una reserva mayor de ornitina permite aumentar la síntesis de urea tras una comida rica en proteínas. En la deficiencia de proteínas, disminuye la velocidad de formación de urea aunque no cesa totalmente.

Podemos concluir que el suministro de sustratos es un determinante importante de la velocidad a la que opera virtualmente cada proceso metabólico corporal. No obstante, las variaciones en el suministro de sustratos no son suficientes para explicar los grandes cambios en el metabolismo que han de tener lugar en el ciclo ayuno–alimentación, por lo que es necesario un control más ajustado de las rutas.

Efectores alostéricos positivos y negativos regulan enzimas clave

Las Figuras 20.11 y 20.12 resumen los efectos de los **efectores alostéricos** positivos y negativos, que son importantes en el hígado durante los estados de buena alimentación y ayuno, respectivamente. Tal como se muestra en la Figura 20.11, la glucosa activa la glucoquinasa (indirectamente al promover su translocación desde el núcleo al citoplasma; véase p. 615), promoviendo de este modo la fosforilación de la glucosa; la glucosa también inactiva la glucógeno fosforilasa y activa la glucógeno sintasa (indirectamente; véase p. 657), con lo cual impide la degradación de glucógeno y promueve su síntesis; la fructosa 2,6-bisfosfato estimula la 6-fosfofructo-1-quinasa e inhibe a la fructosa 1,6-bisfosfatasa, que de esta forma estimula la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis; la fructosa 1,6-bisfosfato activa la piruvato quinasa estimulando, de este modo, la glucólisis; el piruvato activa el complejo de la piruvato deshidrogenasa (indirectamente por inhibición de la piruvato deshidrogenasa quinasa, véase p. 639); el citrato activa la acetil CoA carboxilasa, por lo que estimula la síntesis de ácidos grasos y el malonil CoA inhibe la carnitina palmitil transferasa I, y de este modo, inhibe la oxidación de ácidos grasos.

Tal como se muestra en la Figura 20.12, el acetil CoA estimula la gluconeogénesis en el estado de ayuno activando la piruvato carboxilasa e inhibiendo la piruvato deshidrogenasa (directamente por un efecto alostérico inhibidor y también indirectamente a través de la estimulación de la piruvato deshidrogenasa quinasa; véase p. 639); los ésteres acil CoA de cadena larga inhiben la acetil-CoA carboxilasa, lo cual, a su vez, disminuye el nivel de malonil CoA y permite un aumento en la actividad de la carnitina palmitil transferasa I y en la oxidación de ácidos grasos; la fructosa 6-fosfato inhibe la glucoquinasa (indirectamente al promover su translocación desde el citoplasma al núcleo); el citrato, que incrementa su concentración como consecuencia de un aumento en la oxidación de ácidos grasos, inhibe la 6-fosfo-

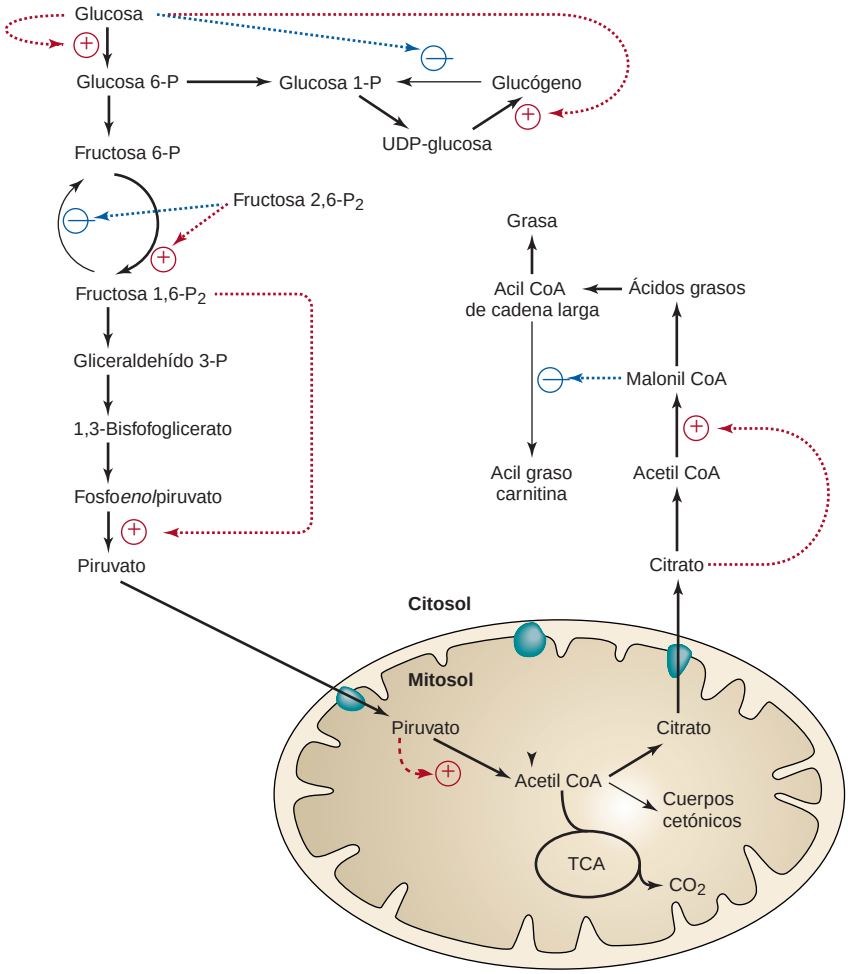


FIGURA 20.11
Control del metabolismo hepático por efectores alostéricos en el estado bien nutrido.

fructo-1-quinasa así como la 6-fosfofructo-2-quinasa (no mostrado); y el NADH que se produce en la oxidación de los ácidos grasos inhibe la actividad del ciclo TCA.

Los efectores alostéricos también regulan el flujo a través de rutas metabólicas en tejidos extrahepáticos. El **citrato**, por ejemplo, sirve probablemente como *sensor de un exceso de disponibilidad de combustible* en una serie de tejidos. Mediante su capacidad de actuación como efector alostérico negativo de la 6-fosfofructo-1-quinasa y como efector alostérico positivo de la acetil-CoA carboxilasa, el citrato regula el flujo tanto de la glucólisis como de la oxidación de los ácidos grasos. Este segundo efecto es indirecto y en él está implicada la activación por el citrato de la acetil-CoA carboxilasa, que aumenta la concentración de **malonil CoA**, el cual es un efector alostérico negativo de la carnitina palmitil transferasa I. Ya que tanto el catabolismo de la glucosa como el de los ácidos grasos pueden aumentar la concentración de citrato y ambos pueden ser inhibidos por el citrato, las células pueden conocer la cantidad de combustible asequible para el catabolismo mediante su concentración de citrato.

El malonil CoA sintetizado en el hígado actúa como intermediario en la síntesis de ácidos grasos y como regulador de la oxidación de ácidos grasos a través de su efecto alostérico negativo sobre la carnitina palmitiltransferasa I. El malonil CoA también se sintetiza en una serie de tejidos, como por ejemplo el músculo esquelético y el corazón, pero en estos tejidos el único motivo de su síntesis es la regulación de la oxidación de los ácidos grasos a nivel de la carnitina palmitiltransferasa I. Los niveles de estado estacionario del malonil CoA son establecidos en los tejidos extrahepáticos por las actividades relativas de la acetil-CoA carboxilasa, un enzima muy regulado, y la malonil-CoA descarboxilasa, un enzima descubierto hace poco que, probablemente, se demostrará que también está sujeto a una regulación estrecha.

$$\text{malonil CoA} \rightarrow \text{acetil CoA} + CO_2$$

Aunque no se muestra en la Figura 20.12, la concentración de cAMP, un importante efector alostérico en sí mismo, también está elevada en el hígado durante

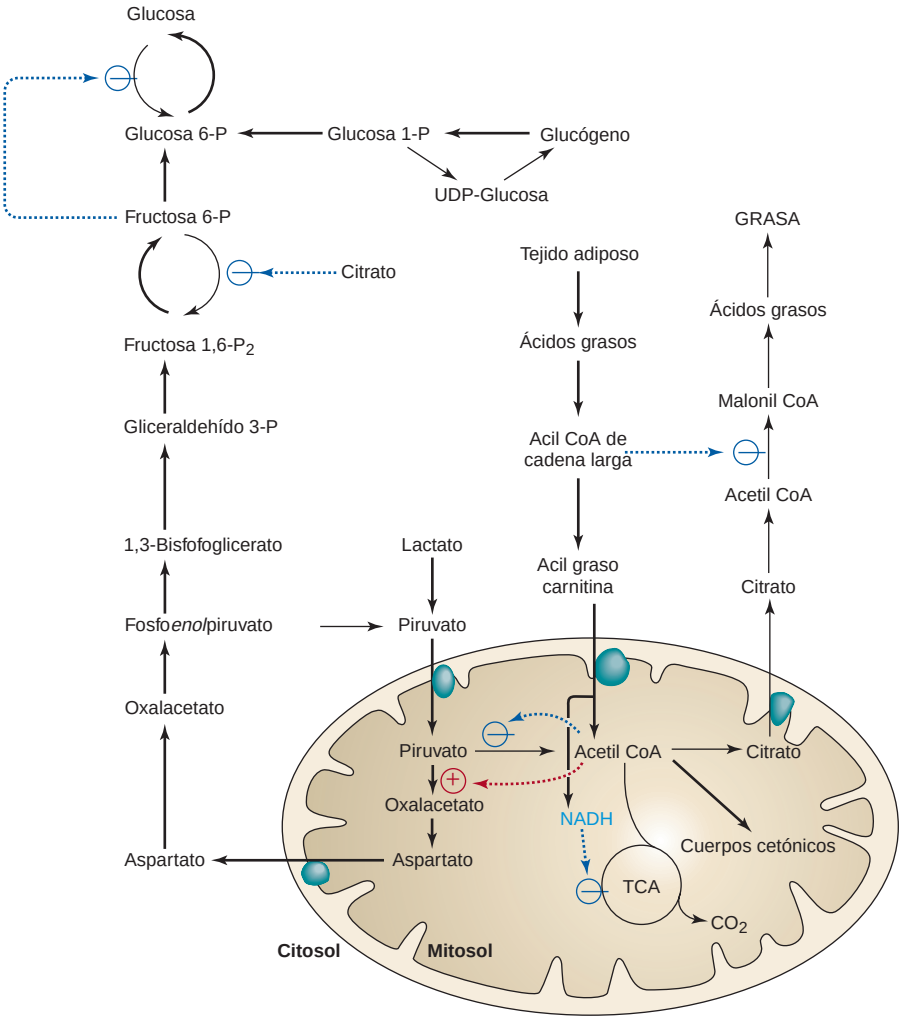
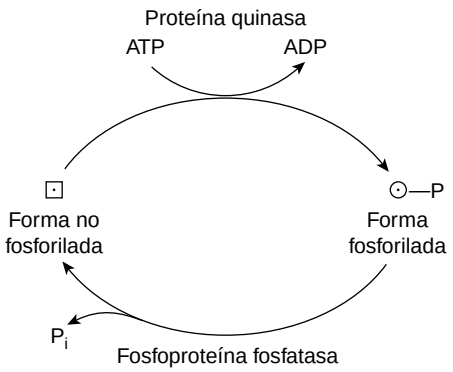


FIGURA 20.12
Control del metabolismo hepático por efectores alostéricos en el estado de ayuno.

la inanición. Funciona como un efector positivo de la proteína quinasa A (también denominada proteína quinasa A dependiente de cAMP), la cual, a su vez, es la responsable de los cambios de las propiedades cinéticas de varios enzimas reguladores por modificación covalente, tal como se resume a continuación.

La modificación covalente regula enzimas clave

Las Figuras 20.13 y 20.14 señalan los enzimas sujetos a **modificación covalente** que desempeñan papeles importantes en la conmutación del hígado entre los estados de buena alimentación y de ayuno. La regulación de los enzimas por modificación covalente se ha tratado en los Capítulos 10 y 14. Recuérdese que ⊡ y ⊙-P representan los estados no fosforilado y fosforilado del enzima, repectivamente.



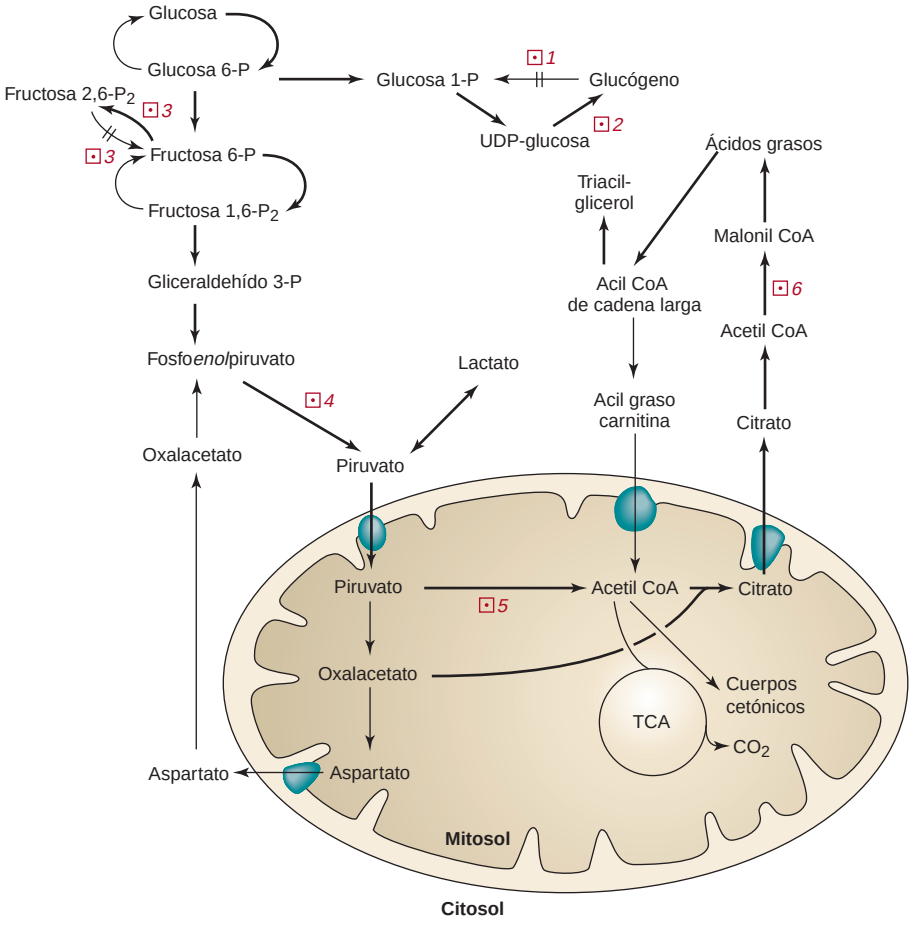


FIGURA 20.13
Actividad y estado de fosforilación de los enzimas sujetos a modulación covalente en el hígado lipogénico.
El modo desfosforilado se indica con el símbolo ⊡. Los enzimas interconvertibles están numerados: *1*, glucógeno fosforilasa; *2*, glucógeno sintasa; *3*, 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa (enzima bifuncional); *4*, piruvato quinasa; *5*, piruvato deshidrogenasa; y *6*, acetil-CoA carboxilasa.

Los puntos importantes son los siguientes: (1) los enzimas sujetos a modificación covalente experimentan fosforilación de uno o más residuos de serina por una proteína quinasa; (2) el enzima fosforilado puede volver al estado desfosforilado por la acción de una fosfoproteína fosfatasa; (3) la fosforilación del enzima modifica su conformación y su actividad catalítica; (4) algunos enzimas sólo son activos en el estado desfosforilado, otros lo son solamente en el estado fosforilado; (5) el cAMP es el mensajero que da la señal para la fosforilación de muchos, aunque no de todos, los enzimas sujetos a modificación covalente; (6) el **cAMP** actúa activando la **proteína quinasa A**; (7) el cAMP también promueve indirectamente la fosforilación de enzimas sujetos a modificación covalente al dar la señal para la inactivación de la fosfoproteína fosfatasa; (8) el glucagón y los agonistas α-adrenérgicos (adrenalina) incrementan los niveles de cAMP al activar la adenilil ciclasa; (9) la insulina (véase p. 944) se opone a la acción del glucagón y de la adrenalina, en parte disminuyendo el nivel de cAMP y en parte a través de mecanismos independientes de cAMP; y, (10) la acción de la insulina promueve en general la desfosforilación de los enzimas sujetos a modificación covalente.

En los animales bien nutridos, los enzimas hepáticos sujetos a modificación covalente se encuentran en la forma desfosforilada (Figura 20.13). Aunque ello no se muestra en la figura, la fosforilasa quinasa también está desfosforilada en este estado. La proporción insulina/glucagón en la sangre es alta y los niveles de cAMP en el hígado son bajos. Esto da lugar a una baja actividad de la proteína quinasa A y a una elevada actividad de la **fosfoproteína fosfatasa**. La glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa (vía fosforilasa quinasa), **6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa** (enzima bifuncional), piruvato quinasa y acetil-CoA carboxilasa son fosforiladas por la proteína quinasa A. Aunque el complejo de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial no está regulado por la proteína quinasa A, que está localizada exclusivamente en el citoplasma, el estado de fosforilación del complejo de la piruvato deshidrogenasa cambia de forma paralela con los enzimas señalados

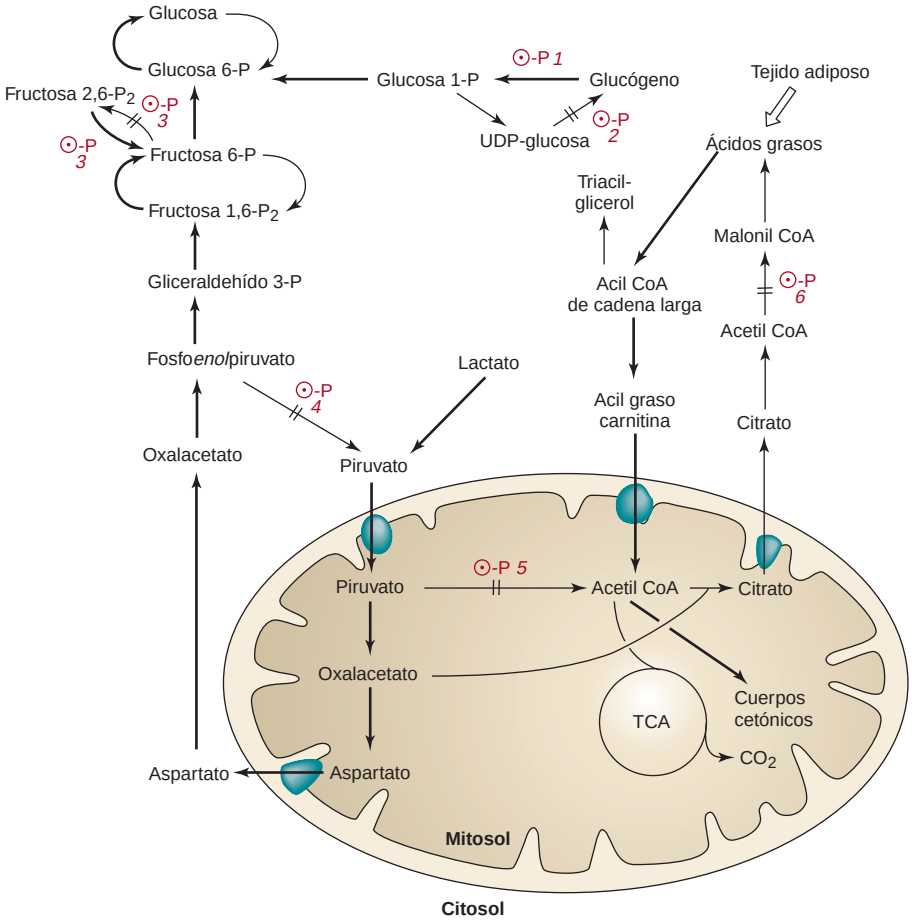


FIGURA 20.14
Actividad y estado de fosforilación de los enzimas sujetos a modulación covalente en el hígado glucogénico.
El modo fosforilado está indicado con el símbolo ⊙-P. Los números se refieren a los mismos enzimas que en la Figura 20.13.

en la Figura 20.13. Dado que tanto la proteína quinasa A como la **piruvato deshidrogenasa quinasa** son relativamente inactivas en el hígado del animal bien nutrido, en este estado prevalecen las formas desfosforiladas de estos enzimas. Tres de los enzimas —**glucógeno fosforilasa**, **fosforilasa quinasa** y la actividad **fructosa-2,6-bisfosfatasa** del enzima bifuncional— son inactivos en la forma desfosforilada. Todos los demás son activos. A consecuencia del estado desfosforilado de estos enzimas, la glucogenogénesis, glucólisis y lipogénesis están muy favorecidas en el hígado del animal bien nutrido. Por otro lado, las rutas opuestas —glucogenólisis, gluconeogénesis y cetogénesis— están inhibidas.

Tal como se muestra en la Figura 20.14, los enzimas hepáticos sujetos a modificación covalente se encuentran fosforilados en el hígado del animal en ayuno. La insulina es baja y el glucagón elevado en la sangre lo que da lugar a un incremento de los niveles hepáticos de cAMP. Esto da lugar a la activación de la proteína quinasa A y a la inactivación de la fosfoproteína fosfatasa. El efecto neto es un mayor grado de fosforilación de los enzimas reguladores que la que se da en el estado de buena alimentación. En el estado de inanición, tres enzimas —glucógeno fosforilasa, fosforilasa quinasa y fructosa-2,6-bisfosfatasa del enzima bifuncional— se encuentran en su estado catalíticamente activo. El resto de los enzimas sujetos a modificación covalente son inactivos en el estado fosforilado. En consecuencia, la glucogenogénesis, la glucólisis y la lipogénesis se detienen casi por completo, mientras que predominan la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la cetogénesis.

Otros dos enzimas hepáticos, la **fenilalanina hidroxilasa** y el **complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa** también está controlados por fosforilación/desfosforilación. Estos enzimas catalizan pasos limitantes de la elimina-

ción de la fenilalanina y de los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), respectivamente. Estos enzimas no se incluyen en las Figuras 20.13 y 20.14 por las especiales características de su control por modificación covalente. La fenilalanina hidroxilasa, un enzima citosólico, es activa en el estado fosforilado, y su fosforilación es estimulada por el glucagón a través de la proteína quinasa A. La fenilalanina actúa como un efector alostérico positivo de la fosforilación e inactivación de la fenilalanina hidroxilasa por la proteína quinasa A. El complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, un complejo multienzimático mitocondrial, es activo en estado desfosforilado y su actividad es regulada por las actividades relativas de una quinasa de la deshidrogenasa de α-cetoácidos de cadena ramificada y una fosfoproteína fosfatasa. Los α-cetoácidos de cadena ramificada activan la deshidrogenasa de α-cetoácidos de cadena ramificada indirectamente por inhibición de la quinasa de la deshidrogenasa de α-cetoácidos de cadena ramificada. La modificación covalente de estos enzimas constituye, pues, un mecanismo de control muy sensible para la degradación de la fenilalanina y los aminoácidos de cadena ramificada. La experiencia clínica de la **fenilcetonuria** y de la **enfermedad del jarabe de arce en la orina** pone de relieve la importancia que tiene el mantenimiento de los niveles de estos aminoácidos en la sangre y en los tejidos. A destacar que el edulcorante artificial **aspartamo** (Nutrasweet™) es el **metil éster de *N*-aspartilfenilalanina**. La cantidad contenida en un litro de bebidas edulcoradas puede aproximarse a la cantidad de fenilalanina obtenida normalmente de la dieta diaria. Esto no es nocivo para individuos normales pero es una amenaza para pacientes con **fenilcetonuria** sometidos a una dieta baja en fenilalanina. La fenilalanina y los aminoácidos de cadena ramificada no pueden ser sintetizados por el ser humano, lo que los convierte en aminoácidos esenciales que han de estar disponibles continuamente para la síntesis proteica. De ahí que la actividad de la fenilalanina hidroxilasa y del complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa tenga que ser controlada cuidadosamente para evitar que se agoten las reservas corporales. En consecuencia, el estado de fosforilación y actividad de estos enzimas está determinado por las necesidades que los tejidos tengan de estos aminoácidos, y no por el ciclo de ayuno–alimentación.

Debido a que también contiene enzimas sujetos a modificación covalente, el **tejido adiposo** responde de manera casi tan espectacular como el hígado al ciclo ayuno–nutrición. En el tejido adiposo de las personas bien nutridas, la piruvato quinasa, el complejo de la piruvato deshidrogenasa, la acetil-CoA carboxilasa y la lipasa sensible a hormona (que no se encuentra en el hígado) se hallan todas en la forma desfosforilada. Al igual que en el hígado, los tres primeros enzimas son activos en forma desfosforilada. La **lipasa sensible a hormona** es inactiva en forma desfosforilada. Un nivel elevado de insulina en sangre y una concentración baja de cAMP en el tejido adiposo son determinantes importantes del estado de fosforilación de estos enzimas, lo que favorece la lipogénesis en el estado de buena nutrición. Durante el ayuno, a consecuencia de la disminución del nivel de insulina y de un incremento del nivel de adrenalina, los adipocitos detienen rápidamente la lipogénesis, al tiempo que activan la lipólisis. Esto se consigue en gran parte por la fosforilación de los enzimas anteriormente descritos. De este modo, el tejido adiposo pasa de ser un tejido destinado a almacenar grasa a ser una fuente de ácidos grasos para su oxidación en otros tejidos y de glicerol para la gluconeogénesis hepática.

La conservación de la glucosa, así como la de los compuestos de tres carbonos que pueden ser convertidos rápidamente en glucosa (lactato, alanina y piruvato) por el hígado, es crucial para la supervivencia en el estado de inanición. Algunas células, particularmente las del sistema nervioso central, dependen por completo de un suministro continuo de glucosa. Los tejidos que pueden utilizar combustibles alternativos detienen invariablemente su utilización de glucosa y compuestos precursores de tres carbonos. Esto se conoce como el ciclo de la glucosa–ácido graso en reconocimiento de que la mayor disponibilidad de ácidos grasos para su oxidación ahorra glucosa en el estado de inanición. La inactivación del complejo de la piruvato deshidrogenasa mediante fosforilación es una característica importante del **ciclo de la glucosa–ácido graso**. Este ciclo tiene lugar en el músculo esquelético, corazón, riñón e hígado, pero no en el sistema nervioso central, cuando los combustibles alternativos (ácidos grasos y cuerpos cetónicos) del estado de inanición pasan a ser abundantes. La activación de la piruvato deshidrogenasa quinasa por productos del catabolismo de los combustibles alternativos (acetil CoA y NADH) es la responsable del mayor grado de fosforilación y, por lo tanto, de la menor actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa.

La modificación covalente, junto con los efectores alostéricos y el suministro de sustrato, es un mecanismo regulador a corto plazo que opera en períodos del orden de minutos. A un plazo más largo, la actividad enzimática está controlada por el nivel de expresión.

Los cambios en los niveles de enzimas clave constituyen un mecanismo adaptativo a largo plazo

El **cambio adaptativo en los niveles enzimáticos** es un mecanismo de regulación que implica cambios en la tasa de síntesis o degradación de enzimas clave. Mientras que los efectores alostéricos y la modificación covalente afectan bien a la K_m, bien a la $V_{máx}$ de un enzima, este modo de regulación implica a la cantidad total de un enzima en un tejido. Debido a la influencia de factores hormonales y nutricionales, se da una mayor o menor cantidad de moléculas de un enzima determinado en el tejido. Por ejemplo, cuando una persona se mantiene continuamente en una condición de buena nutrición o de sobrenutrición, el hígado aumenta su capacidad de sintetizar triacilgliceroles. Esto se puede explicar en parte por el incremento en el suministro de sustrato, así como por cambios adecuados en efectores alostéricos (Figura 20.11) y por la conversión de los enzimas interconvertibles a su forma desfosforilada (Figura 20.13). Sin embargo, esto no es todo, ya que el hígado contiene más moléculas de los enzimas que juegan un papel clave en la síntesis de triacilgliceroles (Figura 20.15). Se induce una batería completa de enzimas, entre ellos glucoquinasa, 6-fosfo-1-fructoquinasa y piruvato quinasa, para aumentar las velocidades de glucólisis; glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y enzima málico para suministrar mayores cantidades de NADPH para la síntesis reductora; y enzima de escisión del citrato, acetil-CoA carboxilasa, sintasa de ácidos grasos y Δ^9-desaturasa para aumentar las velocidades de síntesis de ácidos grasos. Todos estos enzimas se presentan en mayor concentración en el estado de buena alimentación, debido a un aumento de la proporción insulina/glucagón y de la glucosa en la sangre. Mientras que estos enzimas

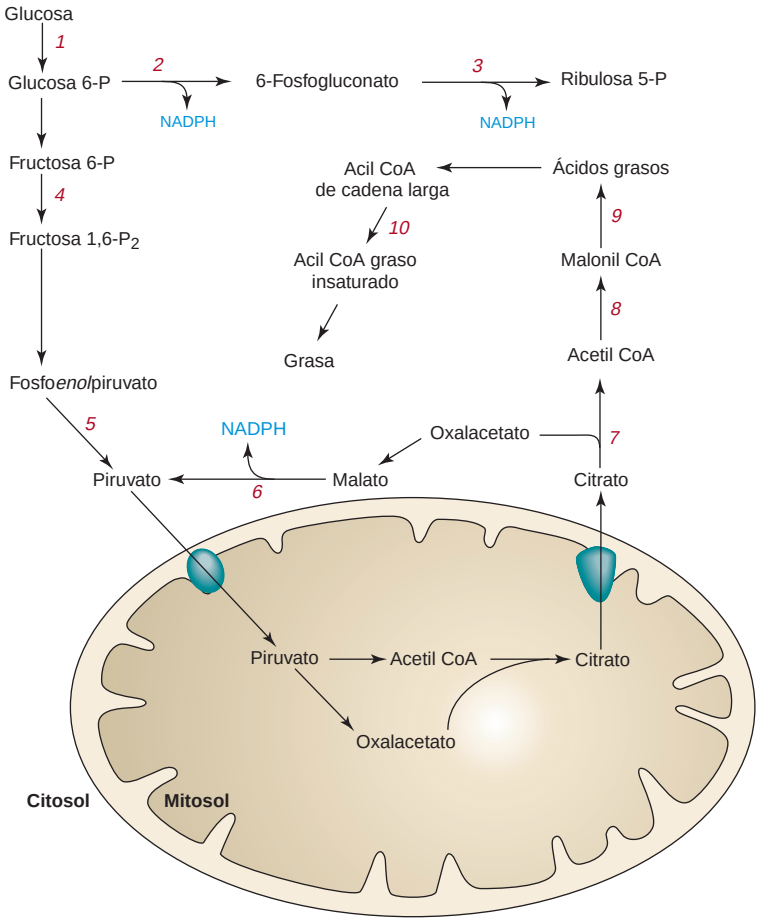


FIGURA 20.15
Enzimas inducidos en el hígado del individuo bien nutrido.
Los enzimas inducibles están numerados: *1*, glucoquinasa; *2*, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; *3*, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; *4*, 6-fosfofructo-1-quinasa; *5*, piruvato quinasa; *6*, enzima málico, *7*, enzima de escisión del citrato; *8*, acetil-CoA carboxilasa; *9*, ácido graso sintasa; y *10*, Δ^9-desaturasa.

son inducidos, con los enzimas que favorecen la síntesis de glucosa sucede lo opuesto. La **fosfo*enol*piruvato carboxiquinasa**, piruvato deshidrogenasa quinasa, **piruvato carboxilasa,** fructosa 1,6-bisfosfatasa, **glucosa 6-fosfatasa** y algunas aminotransferasas disminuyen en cantidad; es decir, su síntesis está deprimida, o su degradación incrementada, en respuesta al incremento de glucosa e insulina circulantes.

En el estado de ayuno, el patrón enzimático del hígado cambia de forma espectacular (Figura 20.16). Los enzimas que intervienen en la lipogénesis disminuyen en cantidad, posiblemente porque su síntesis está reprimida o su degradación acelerada. Al mismo tiempo, se inducen una serie de enzimas (glucosa 6-fosfatasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, fosfo*enol*piruvato carboxiquinasa, piruvato carboxilasa y algunas aminotransferasas) que favorecen la gluconeogénesis, lo que hace que el hígado sea mucho más efectivo en su capacidad de sintetizar glucosa. La inanición también induce la piruvato deshidrogenasa quinasa (no mostrado en la Figura 20.16), el enzima responsable de la fosforilación e inactivación del complejo de la piruvato deshidrogenasa, lo que impide la conversión del piruvato en acetil CoA, conservndo así los carbonos del lactato, piruvato y aminoácidos para la síntesis de glucosa. De igual modo, la inducción de la carnitina palmitiltransferasa I y de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa incrementa la capacidad del hígado para oxidar ácidos grasos y para la cetogénesis, siendo la primera una fuente primaria del ATP necesario para la síntesis de glucosa hepática. Además se inducen los enzimas del ciclo de la urea y otros enzimas que metabolizan aminoácidos, tales como la **glutaminasa**, tirosina aminotransferasa, serina deshidratasa, prolina oxidasa e histidasa, posiblemente por la presencia de elevados niveles sanguíneos de glucagón. Esto permite la eliminación del nitrógeno, en forma de urea, proveniente de los aminoácidos utilizados en la gluconeogénesis.

Cada vez se conocen mejor los conmutadores que controlan estos procesos a largo plazo. Es probable que un miembro de la familia de receptores nucleares, denominado **receptor α de peroxisomas activado por proliferador (PPARα)** sirva de receptor de ácidos grasos, especialmente en el hígado, riñón y corazón. Cuando el receptor fija ácidos grasos puede activar la transcripción de una serie de genes implicados en la eliminación de ácidos grasos entre los que se incluyen enzimas de los sis-

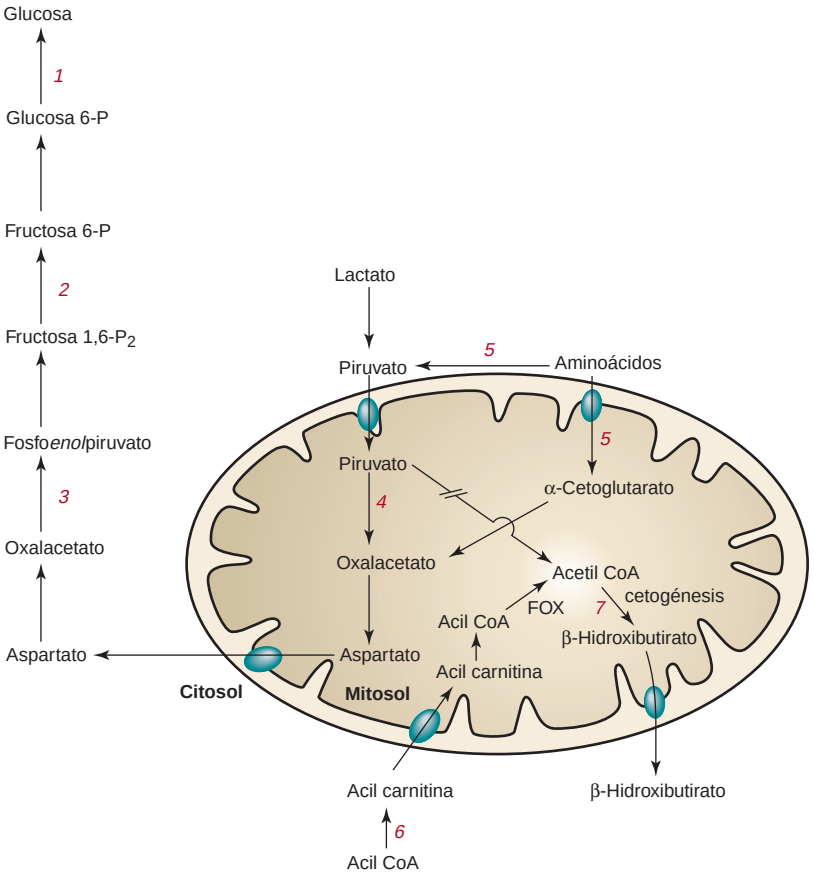


FIGURA 20.16
Enzimas inducidos en el hígado de un individuo durante el ayuno.
Los enzimas inducibles están numerados: *1*, glucosa 6-fosfatasa; *2*, fructosa 1,6-bisfosfatasa; *3*, fosfo*enol*piruvato carboxiquinasa; *4*, piruvato carboxilasa; *5*, diversas aminotransferasas; *6*, carnitina palmitiltransferasa I y *7*, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa. Las líneas paralelas que interseccionan una flecha desde el piruvato al acetil CoA denotan inhibición (debida a fosforilación) del complejo de la piruvato deshidrogenasa debido a inducción de la piruvato deshidrogenasa quinasa. Abreviatura: FOX, oxidación de ácidos grasos.

temas peroxisómico, microsómico y mitocondrial de la oxidación de los ácidos grasos, genes de apolipoproteínas, tales como la VLDL, necesarias para la exportación de triacilgliceroles desde el hígado y enzimas de la cetogénesis. En el tejido adiposo se expresa de manera diferencial otra isoforma de PPAR, la PPARγ. Cuando está activada (quizás por diversos derivados de ácidos grasos como por ejemplo las prostaglandinas), orquesta la diferenciación de los pre-adipocitos a adipocitos. Esto aumenta la capacidad de los adipocitos para almacenar ácidos grasos. Otro factor de transcripción que interviene a este nivel de control es el **factor de unión del elemento regulador de esteroides (SREBP)**. Cuando disminuyen los niveles de colesterol, el SREBP, que está anclado en el retículo endoplasmático, es cortado por una proteasa con liberación del fragmento N-terminal de la proteína que actúa como un activador de la transcripción de enzimas que intervienen en la biosíntesis de esteroles y ácidos grasos tales como la ATP citrato liasa, ácido graso sintasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, escualeno sintasa y el receptor de LDL. El nivel de SREBP también está modulado por la insulina y la captación de glúcidos y, probablement, controla el incremento en la síntesis de ácidos grasos que acompaña el incremento durante largo tiempo en la ingesta de glúcidos.

Estos cambios adapativos son claramente importantes en el ciclo inanición–nutrición, y afectan sobremanera a la capacidad del hígado para llevar a cabo sus diversos procesos metabólicos. Los cambios adaptativos también influyen en la efectividad de los mecanismos reguladores a corto plazo. Por ejemplo, la inanición prolongada o la diabetes incontrolada disminuyen grandemente el nivel de acetil-CoA carboxilasa. La eliminación de ésteres acil CoA de cadena larga que inhiben este enzima, un incremento en el nivel de citrato que activa este enzima, o la creación de condiciones que activen este enzima por desfosforilación no tendrán ningún efecto cuando el enzima esté virtualmente ausente. Otro ejemplo lo constituye la **intolerancia a la glucosa** durante la inanición. Una persona sometida a inanición crónica no puede utilizar efectivamente una carga súbita de glucosa debido a la ausencia de los enzimas clave necesarios para el metabolismo de la glucosa. Una carga de glucosa, sin embargo, pondrá en movimiento la inducción de los enzimas requeridos y el restablecimiento de los mecanismos reguladores a corto plazo.

20.4 INTERRELACIONES METABÓLICAS DE LOS TEJIDOS EN DIVERSOS ESTADOS NUTRICIONALES Y HORMONALES

Gran parte de los cambios que tienen lugar en diversos estados nutricionales y hormonales son variaciones del ciclo inanición–nutrición y son completamente predecibles en base a lo que hemos aprendido acerca del ciclo. En la Figura 20.17 se dan algunos ejemplos. Otros son tan obvios que no requieren un diagrama; por ejemplo, en el crecimiento rápido de un niño, los aminoácidos se desvían del catabolismo y se dedican a la síntesis de proteínas. Sin embargo, los cambios que tienen lugar en algunas situaciones fisiológicamente importantes son bastante sutiles y se conocen poco. Un ejemplo de esto último es el proceso de envejecimiento que parece conducir a una sensibilidad disminuida de los principales tejidos corporales a las hormonas. La consecuencia importante de ello es una reducción en la capacidad de los tejidos para responder normalmente durante el ciclo nutrición–inanición. No se sabe si esto es un factor contribuyente al proceso de envejecimiento o una consecuencia del mismo.

La permanencia en el estado de buena nutrición da como resultado la obesidad y la resistencia a la insulina

La Figura 20.17*a* ilustra las interrelaciones metabólicas que predominan en una persona obesa. La mayor parte de la grasa corporal del ser humano es proporcionada por la dieta o es sintetizada en el hígado y transportada al tejido adiposo para su almacenamiento. La obesidad se origina porque una persona se mantiene en un estado tan bien nutrido que la grasa almacenada no se utiliza durante la fase de ayuno del ciclo. El cuerpo no tiene, por tanto, más opción que acumular grasa (véase Apli. Clín. 20.1).

La **obesidad** provoca siempre algún grado de **resistencia a la insulina**. La resistencia a la insulina es un fenómeno poco conocido, en el cual los tejidos no responden a la insulina. En algunos pacientes, el número o la afinidad de los recepto-

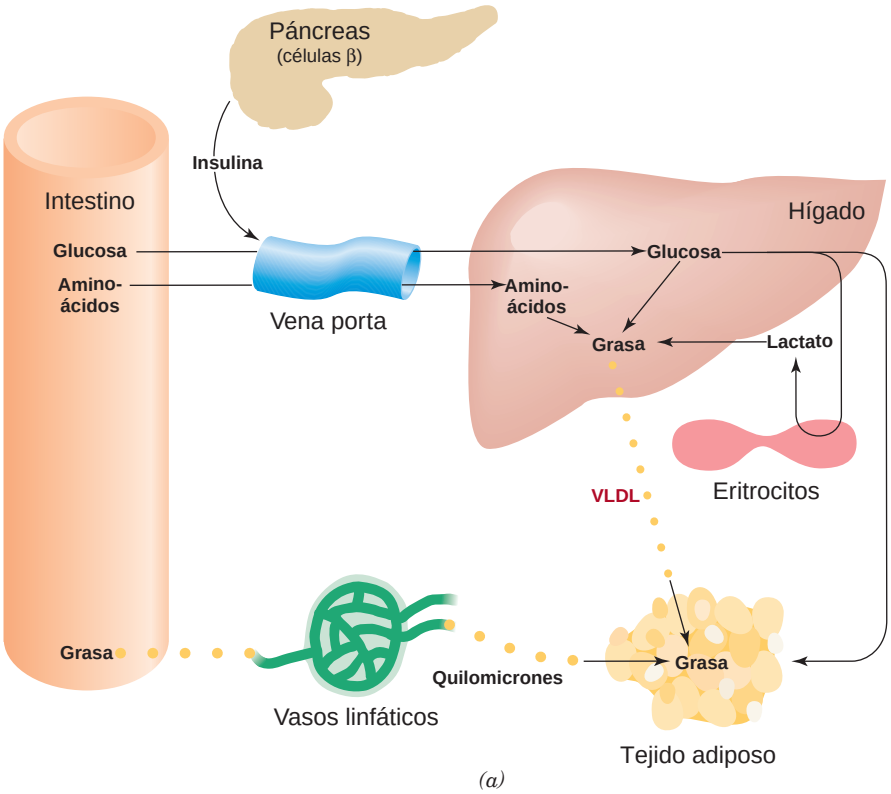
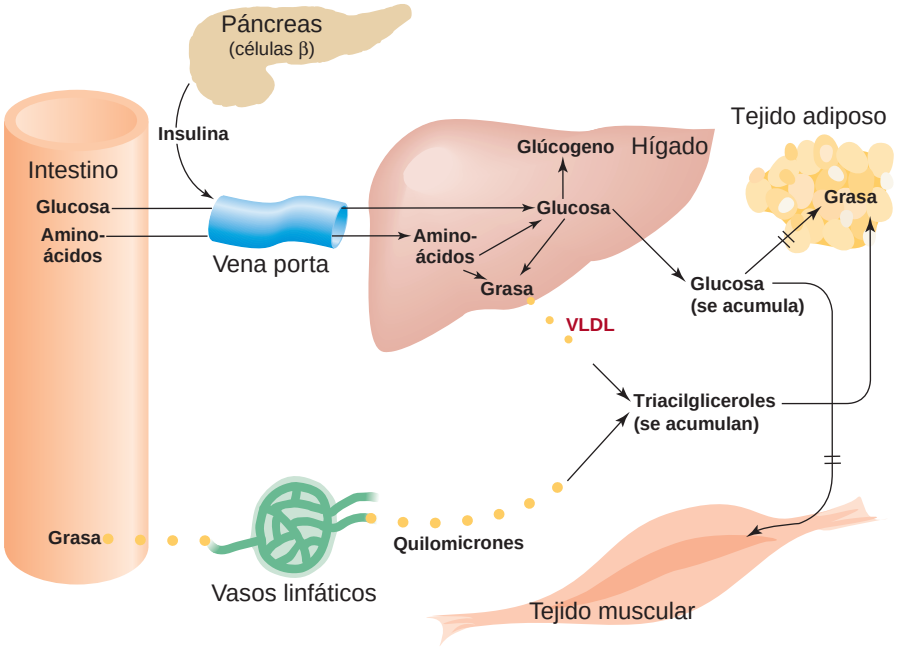


FIGURA 20.17
Interrelaciones metabólicas de los tejidos en diversos estados nutricionales, hormonales y patológicos.
(*a*) Obesidad.

res de insulina disminuye; en otros, la unión de la insulina es normal, pero la respuestas posteriores al receptor, tales como la activación del transporte de glucosa, están alteradas. Como regla general se puede decir que cuanto mayor es la cantidad de grasa en el cuerpo, mayor es la resistencia de las células normalmente sensibles a insulina a la acción de la misma. Las células grasas producen dos hormonas, factor α de la necrosis tumoral (TNF-α) y una proteína descubierta recientemente, la resistina, que parecen ser responsables de la inducción de la resistencia a la insulina. A consecuencia de ello, la sangre de un individuo obeso presenta niveles de insulina plasmática muy elevados. Mientras las células β del páncreas produzcan suficiente insulina para superar la resistencia a la insulina, un individuo obeso presentará niveles de glucosa y lipoproteínas en sangre relativamente normales. Como se tratará a continuación, la resistencia a la insulina de la obesidad puede dar lugar, sin embargo, al desarrollo de la diabetes tipo 2.

Diabetes mellitus tipo 2

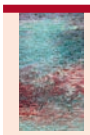
En la Figura 20.17*b* se muestran las interrelaciones metabólicas características de una persona que padece **diabetes tipo 2**, también denominada diabetes no dependiente de insulina. A diferencia de la diabetes tipo 1, o diabetes dependiente de insulina, en este caso la insulina está presente (véase Apli. Clín. 20.7) siendo el problema la resistencia a la acción de la insulina junto con una producción insuficiente de insulina por las células β que pueda superar la resistencia. La mayoría de pacientes con tipo 2 son obesos y aunque los niveles de insulina son a menudo altos, no son tan altos como en una persona no diabética pero igualmente obesa. El páncreas de estos pacientes diabéticos no produce suficiente insulina para superar su resistencia a la insulina. De ahí que este tipo de diabetes sea también una forma de deficiencia de las células β; la insulina exógena reducirá la hiperglucemia y a menudo ha de administrarse a pacientes diabéticos no dependientes de insulina para controlar sus niveles de glucosa en sangre. Se produce la hiperglucemia principalmente por la baja captación de glucosa por los tejidos periféricos, especialmente el músculo. Mientras que la insulina normalmente estimula la translocación de vesículas intracelulares portadoras de **GLUT-4 (isoforma 4 del *t*ransportador de *glu*cosa)** a la membrana plasmática, esto está impedido en gran parte en la diabetes



(b)

FIGURA 20.17 (continuación)
(*b*) Diabetes mellitus no dependiente de insulina.

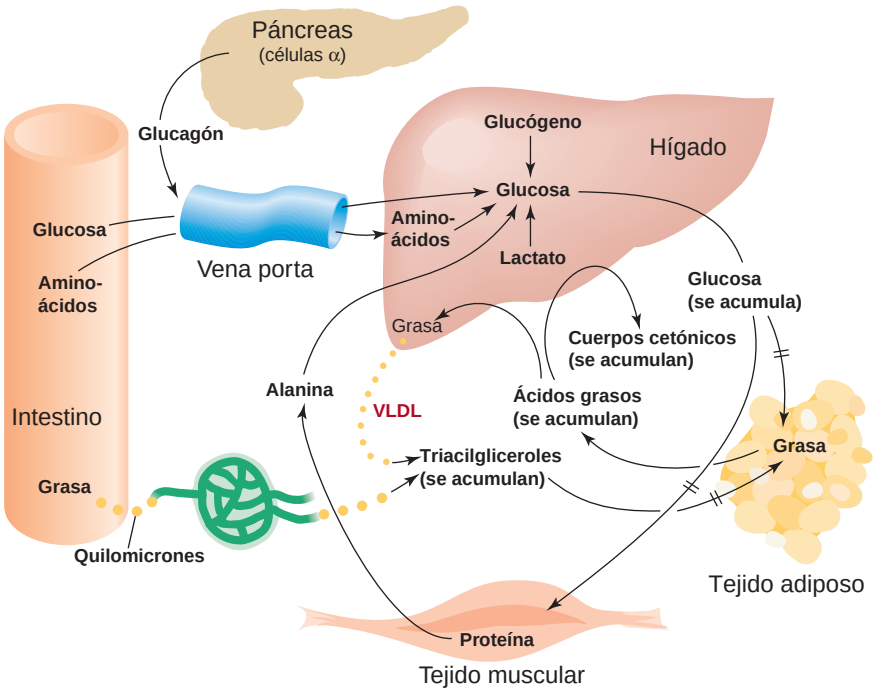
tipo 2 por la resistencia a la insulina. En contraste con la diabetes tipo 1, en la diabetes tipo 2 no se produce normalmente cetoacidosis, quizás porque hay suficiente insulina presente en la diabetes tipo 2 para impedir la liberación incontrolada de ácidos grasos por lipólisis en los adipocitos. La hipertriacilglicerolemia es caracte-



APLICACIÓN CLÍNICA 20.7
Diabetes mellitus tipo 2 (no dependiente de insulina)

La diabetes mellitus tipo 2 constituye el 80–90% de los casos diagnosticados de diabetes. Se denomina también diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), para diferenciarla de la diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM). Aparece normalmente en personas obesas de edad madura o ancianas. La diabetes no dependiente de insulina se caracteriza por hiperglucemia y a menudo hipertrigliceridemia y otras características del síndrome X (véase Apli. Clín. 20.1). No se observa en ella la cetoacidosis característica de la enfermedad dependiente de insulina. Los niveles elevados de VLDL son probablemente resultado de la síntesis incrementada de triacilgliceroles en el hígado, estimulada por la hiperglucemia y la hiperinsulinemia. La insulina se halla presente en cantidades casi normales, o incluso elevadas, en esta forma de enfermedad. La obesidad aparece a menudo antes del desarrollo de la diabetes independiente de insulina, y parece ser el factor que contribuye de manera más importante a ésta última. Los pacientes obesos son a menudo hiperinsulinémicos. Datos recientes atribuyen a los elevados niveles de expresión del factor α de necrosis tumoral (TNF-α) y a una nueva proteína denominada resistina en los adipocitos como la causa de la resistencia. Cuanto mayor es la masa del tejido adiposo, mayor es la producción de TNF-α y resistina las cuales actúan desequilibrando la función del receptor de la insulina. Se ha establecido una relación inversa entre los niveles de insulina y el número de receptores de insulina. Cuanto más elevado es el nivel basal de insulina, menor es el número de receptores en las membranas plasmáticas. Además, también se producen defectos en las células que responden a la insulina en procesos posteriores a la unión al receptor. Un ejemplo de ello es la capacidad de la insulina para obtener transportadores de glucosa (GLUT-4) que pasan del interior de la célula a la membrana plasmática. La consecuencia es que los niveles de insulina permanecen elevados, mientras que los niveles de glucosa están muy poco controlados debido a la falta de respuesta normal a la insulina. Aunque el nivel de insulina es aquí alto, no es sin embargo tan alto como el de una persona obesa no diabética. Dicho de otro modo, existe una deficiencia relativa en el suministro de insulina por las células β. Por lo tanto, esta enfermedad está causada no sólo por la resistencia a la insulina sino también por un desequilibrio en la función de las células β, lo que da lugar a una deficiencia relativa de insulina. La dieta sola puede controlar la enfermedad en el diabético obeso. Si se puede motivar a una persona a perder peso, los receptores de insulina aumentarán en número y las anomalías posreceptor mejorarán, lo que, a su vez, comportará un incremento tanto en la tolerancia a la glucosa como en la sensibilidad tisular a la insulina. El diabético tipo 2 no manifiesta una tendencia a desarrollar cetoacidosis, aunque desarrolla las mismas complicaciones que el diabético insulino–dependiente, esto es, neuropatía, retinopatía, enfermedad renal y enfermedad arterial coronaria.

Kahn, B. B. y Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106:473, 2000; Cavaghan, M. K., Ehrmann, D. A. y Polonsky, K. S. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J. Clin. Invest.* 106:329, 2000; y Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Shima, R. S. y Lazar, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307, 2001.



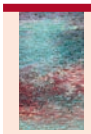
(c)

FIGURA 20.17 (continuación)
(*c*) Diabetes mellitus dependiente de insulina.

rística de la diabetes tipo 2, pero generalmente da lugar a un incremento de la VLDL sin hiperquilomicronemia. El motivo se halla, con gran probabilidad, en las rápidas tasas de síntesis hepática *de novo* de ácidos grasos y VLDL, más que en un suministro incrementado de ácidos grasos a partir del tejido adiposo.

Diabetes mellitus tipo 1

La Figura 20.17*c* muestra las interrelaciones metabólicas que tienen lugar en la **diabetes mellitus tipo 1 o dependiente de insulina** (Aplis. Clíns. 20.8 y 20.9). A diferencia de la diabetes tipo 2, en esta enfermedad hay una ausencia absoluta de pro-

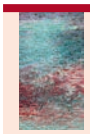


APLICACIÓN CLÍNICA 20.8
Diabetes mellitus tipo 1 (dependiente de insulina)

La diabetes mellitus tipo 1 o dependiente de insulina (IDDM) se denominaba antiguamente diabetes de aparición juvenil, ya que aparece normalmente en la infancia o en la adolescencia, aunque no se limita a estos pacientes. La insulina está ausente, o casi, en esta enfermedad, debido a la ausencia de células β del páncreas, o que éstas son defectuosas. Las células β son destruidas por un proceso autoinmune. Cuando no se trata, la diabetes tipo 1 se caracteriza por hiperglucemia, hiperlipoproteinemia (quilomicrones y VLDL), y episodios de cetoacidosis severa. Lejos de ser una enfermedad que genere solamente defectos en el metabolismo glucídico, también produce anomalías en el metabolismo de las grasas y de las proteínas. La hiperglucemia proviene, en parte, de la incapacidad de los tejidos dependientes de insulina para captar la glucosa plasmática y, en parte, de la gluconeogénesis hepática acelerada a partir de aminoácidos provenientes de proteína muscular. La cetoacidosis proviene de la lipólisis aumentada en el tejido adiposo y de la oxidación acelerada de ácidos grasos en el hígado. La hiperquilomicronemia es el resultado de la baja actividad lipoproteína lipasa en los capilares del tejido adiposo, un enzima que depende de la insulina para su síntesis.

Aunque la insulina no cura la diabetes, su utilización altera marcadamente el curso clínico de la enfermedad. La insulina inyectada promueve la captación de glucosa por los tejidos e inhibe la gluconeogénesis, lipólisis y proteólisis. El paciente tiene la difícil misión de intentar ajustar la dosis de insulina en función de su dieta y de su actividad física variable, el otro determinante importante para la eliminación de glucosa por parte del músculo. El control estricto requiere la administración de varias inyecciones de insulina cada día y la comprobación minuciosa de la glucosa sanguínea por el paciente. Actualmente, se ha comprobado que el control estricto de la glucosa sanguínea reduce las complicaciones microvasculares de la diabetes (nefropatías y retinopatías).

Atkinson, M. A. y Maclaren, N. K. The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 331:1428, 1994; Clark, C. M. y Lee, D. A. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 332:1210, 1994; Luppi, P. y Trucco, M. Immunolgical models of type 1 diabetes. *Horm. Res.* 52:1, 1999; y Kukreja, A. y Maclaren, N. K. Autoimmunity and diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:4371, 1999.



APLICACIÓN CLÍNICA 20.9

Complicaciones de la diabetes y ruta de los polioles

Varios desórdenes que pueden compartir una patogénesis común complican la diabetes. El cristalino, nervio periférico, papilas renales, células de Schwann, glomérulo y, posiblemente, los capilares de la retina contienen dos enzimas que constituyen la ruta de los polioles (el vocablo poliol hace referencia a glúcidos polihidroxilados). El primero es la aldosa reductasa, un enzima que requiere NADPH y que reduce la glucosa formando sorbitol, el cual es metabolizado a continuación por la sorbitol deshidrogenasa, un enzima que requiere NAD^+ y que oxida el sorbitol a fructosa. La aldosa reductasa tiene una K_m para la glucosa elevada, por lo que esta ruta sólo es cuantitativamente importante durante la hiperglucemia. Se sabe que en los animales diabéticos el contenido de sorbitol en el cristalino, nervios y glomérulo es elevado. La acumulación de sorbitol puede dañar estos tejidos al provocar su hinchazón. Actualmente, se dispone de inhibidores de la reductasa que impiden la acumulación de sorbitol en estos tejidos retrasando la aparición de dichas complicaciones. Esta es una cuestión muy controvertida ya que las diferencias entre la potencia de los inhibidores, diseños experimentales y duración de los ensayos ha dado lugar a que los diferentes estudios hayan llevado a diferentes conclusiones. Un metanálisis reciente concluyó que estos fármacos reducen la velocidad de progresión de la lesión a los nervios motores, pero no se ha demostrado que mejoren las lesiones de los nervios sensoriales. Esto último es importante debido a la condición conocida como neuropatía diabética dolorosa en la que están implicados estos nervios.

Frank, R. N. The aldose reductase controversy. *Diabetes* 43:169, 1994; King, G. L. y Brownlee, M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25:255, 1996; Clark, C. M. y Lee, D. A. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 332:1210, 1994; y Airey, M., Bennett, C., Nicolucci, A. y Williams, R. Aldose reductase inhibitors for the prevention and treatment of diabetic peripheral neuropathy. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002:182, 2000.

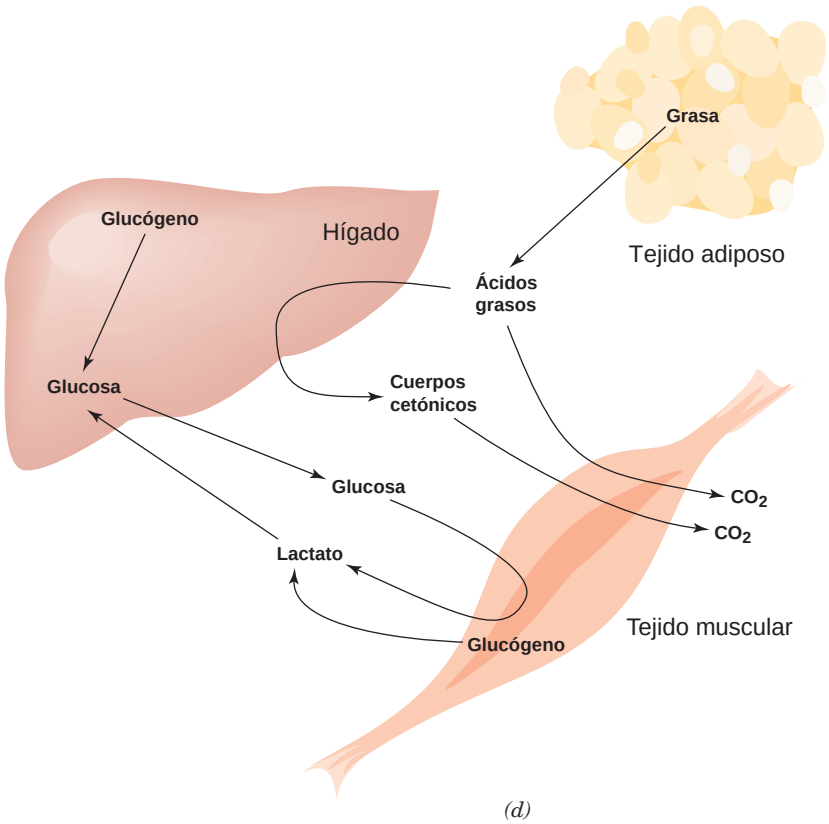
ducción de insulina por parte del páncreas. Debido a la producción defectuosa de insulina por las células β, los niveles sanguíneos de insulina no aumentan en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre. Incluso cuando se transfiere glucosa de la dieta desde el intestino, la proporción insulina/glucagón no puede aumentar, con lo que el hígado permanece en estado gluconeogénico y cetogénico. Dado que es imposible conmutar a los procesos de glucólisis, glucogenogénesis y lipogénesis, el hígado no puede tamponar adecuadamente los niveles de glucosa sanguínea. Por supuesto, dado que la gluconeogénesis es continua, el hígado contribuye a la hiperglucemia en el estado de buena alimentación. La imposibilidad de algunos tejidos, especialmente el músculo y el tejido adiposo, para captar glucosa en ausencia de insulina, porque **GLUT-4** permanece secuestrado en el interior de las células, contribuye grandemente a la hiperglucemia. La gluconeogénesis acelerada, propulsada por el sustrato suministrado por la degradación de proteínas corporales, mantiene la hiperglucemia incluso en el estado de inanición.

La ausencia de insulina en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 da como resultado una velocidad incontrolada de la lipólisis en el tejido adiposo. Ello aumenta los niveles sanguíneos de ácidos grasos y da lugar a la producción acelerada de cuerpos cetónicos por el hígado. Si los cuerpos cetónicos no se utilizan tan rápidamente como se forman, se produce cetoacidosis diabética, debido a la acumulación de cuerpos cetónicos y de protones. No todos los ácidos grasos captados por el hígado pueden ser tratados por la ruta de la oxidación de los ácidos grasos y la cetogénesis. El exceso se esterifica y se dirige hacia la síntesis de VLDL. Se produce **hipertriacilglicerolemia** porque la VLDL se sintetiza y libera por el hígado más rápidamente de lo que estas partículas pueden ser eliminadas de la sangre por la lipoproteína lipasa. La expresión de este enzima depende del nivel de insulina, y como resultado, los diabéticos tipo 1 no tratados tienen a menudo hiperquilomicronemia. En resumen, en la diabetes cada tejido continúa desempeñando el papel catabólico que le corresponde en el estado de inanición, a pesar de que desde el intestino se le suministre las cantidades adecuadas, o incluso en exceso, de combustible. Ello da como resultado un incremento enorme de todos los combustibles en la sangre con una destrucción grave de los tejidos corporales que puede ocasionar la muerte a menos que se administre insulina, de ahí el término "insulino-dependiente": estos pacientes morirán si no se les administra insulina.

Los ejercicios aeróbico y anaeróbico utilizan combustibles diferentes

Es importante diferenciar entre dos tipos diferentes de **ejercicio: aeróbico** y **anaeróbico**. El ejercicio aeróbico se da, por ejemplo, en las carreras de fondo, mientras que ejemplos de ejercicio anaeróbico pueden ser las carreras de "sprint" o el levantamiento de pesas. Durante el ejercicio anaeróbico, la cooperación entre los órganos del cuerpo es muy limitada. Los vasos sanguíneos dentro de los músculos se en-

cuentran comprimidos durante la contracción punta, de forma que estas células quedan aisladas del resto del cuerpo. El músculo depende en gran manera de sus propias reservas de glucógeno y fosfocreatina. La **fosfocreatina** actúa como fuente de enlaces fosfato de alta energía para la síntesis de ATP (Figura 20.7) hasta que se estimulan la glucogenólisis y la glucólisis. La glucólisis pasa a ser la fuente primaria de ATP por falta de oxígeno. El ejercicio aeróbico es, metabólicamente, más interesante (Figura 20.17*d*). Para el ejercicio moderado, gran parte de la energía se obtiene a partir de la glucólisis del glucógeno muscular. Este hecho bioquímico es la base de la **carga glucídica**. El contenido en glucógeno muscular puede incrementarse mediante el ejercicio exhaustivo, que agota el glucógeno, seguido de descanso y una dieta rica en glúcidos. La captación de glucosa de la sangre también está incrementada como consecuencia de la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática, proceso que tiene lugar independientemente de la insulina durante el ejercicio. Asimismo, se produce una estimulación de la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada, producción de amonio y liberación de alanina desde el músculo ejercitado. No obstante, un individuo bien alimentado no almacena suficiente glucosa ni glucógeno para proporcionar la energía necesaria para correr distancias largas. El **cociente respiratorio**, la proporción entre el dióxido de carbono exhalado y el oxígeno consumido, disminuyen durante una carrera de fondo. Esto indica que durante la carrera se produce una conmutación progresiva desde la oxidación de glucógeno hacia la oxidación de ácidos grasos. La lipólisis aumenta gradualmente a medida que las reservas de glucosa se agotan, hasta que, como ocurre en el estado de ayuno, el músculo oxida ácidos grasos con preferencia a la glucosa, debido a la mayor disponibilidad de aquéllos. La velocidad de oxidación de ácidos grasos también aumenta como consecuencia de una disminución de la concentración de malonil CoA, lo que permite una mayor actividad carnitina palmitil-transferasa I. Una disminución de la concentración de ATP debido a la demanda de la contracción muscular da lugar a un incremento en AMP, un efector alostérico positivo de la proteína quinasa activada por AMP, la cual, a su vez, fosforila e inactiva la acetil-CoA carboxilasa. Esto, junto con un incremento de ésteres acil CoA de cadena larga, que son efectores alostéricos negativos de la acetil-CoA carboxilasa, da como resultado una menor concentración de estado estacionario del malonil CoA y, por tanto, una mayor actividad carnitina pal-



(*d*)

FIGURA 20.17 (continuación)
(*d*) Ejercicio.

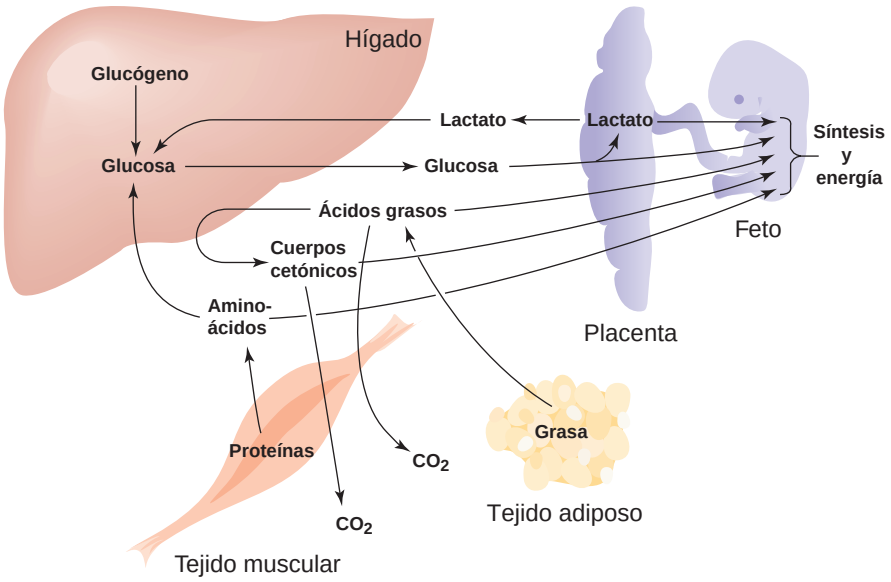
mitiltransferasa I y oxidación de ácidos grasos. Al contrario de lo que ocurre durante el ayuno, la concentración de cuerpos cetónicos en la sangre aumenta poco durante el ejercicio lo cual podría ser simplemente un reflejo del equilibrio que se da entre la producción hepática de cuerpos cetónicos y su oxidación muscular.

Los cambios en el embarazo están relacionados con las necesidades fetales y con los cambios hormonales

El feto puede considerarse como otro tejido que requiere nutrientes (Figura 20.17*e*). Emplea fundamentalmente glucosa para obtener energía, si bien también puede utilizar aminoácidos, lactato, ácidos grasos y cuerpos cetónicos. El lactato producido en la **placenta** mediante glucólisis tiene dos destinos: parte del mismo se dirige al feto donde es utilizado como combustible, mientras que el resto retorna a la circulación materna para establecer un ciclo de Cori con el hígado. El colesterol de la LDL materna es un importante precursor de los esteroides de la placenta (estradiol y progesterona). Durante el **embarazo**, el ciclo de ayuno–alimentación queda perturbado. La placenta segrega una hormona polipeptídica, el **lactógeno placentario**, y dos hormonas esteroides, estradiol y progesterona. El lactógeno placentario estimula la lipólisis en el tejido adiposo, mientras que las hormonas esteroides inducen un estado resistente a la insulina. En el estado postprandial, las mujeres embarazadas entran en el estado de inanición más rápidamente que las mujeres no embarazadas, debido al consumo incrementado de glucosa y aminoácidos por parte del feto. Los niveles plasmáticos de glucosa, aminoácidos e insulina caen rápidamente, mientras que los niveles de glucagón y lactógeno placentario aumentan y estimulan la lipólisis y la cetogénesis. El consumo de glucosa y aminoácidos por parte del feto puede llegar a ser tan grande que induzca en la madre una hipoglucemia. Por otro lado, en estado de buena alimentación, la mujer embarazada tiene incrementados los niveles de insulina y glucosa, y presenta resistencia a la insulina exógena. Estas alteraciones hormonales y de combustibles en el plasma son todavía más pronunciadas en las mujeres embarazadas diabéticas, lo que hace que el control de glucosa sanguínea sea difícil en estas pacientes. Esto es importante puesto que la hiperglucemia afecta de manera adversa el desarrollo del feto.

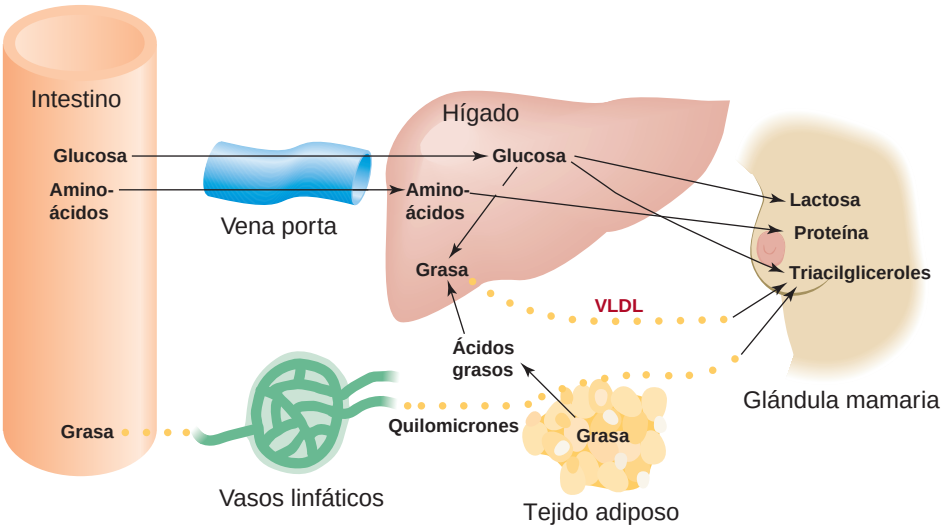
La lactancia requiere síntesis de lactosa, triacilgliceroles y proteínas

Al final del embarazo, las hormonas placentarias inducen lipoproteína lipasa en la glándula mamaria y promueven el desarrollo de las células y conductos secretores



(e)

FIGURA 20.17 (continuación)
(*e*) Embarazo.



(f)

FIGURA 20.17 (continuación)
(*f*) Lactancia.

de leche. Durante la **lactancia** (Figura 20.17*f*), el pecho utiliza glucosa para la síntesis de **lactosa** y triacilgliceroles, como principal fuente de energía. Se captan aminoácidos para la síntesis de proteínas, y los quilomicrones y la VLDL se utilizan como fuente de ácidos grasos para la síntesis de triacilgliceroles. Si no se suministran estos compuestos mediante la dieta, entonces deben ser suministrados por proteólisis, gluconeogénesis y lipólisis, lo que conduce en último término a malnutrición de la madre y a la producción de leche de baja calidad. El pecho materno también secreta una hormona que en algunos aspectos es similar a la hormona paratiroidea (véase p. 915), la cual puede ser importante para la absorción de calcio y fósforo del intestino y el hueso.

El estrés y la lesión conducen a cambios metabólicos

El estrés fisiológico incluye las **heridas**, **cirugía**, **insuficiencia renal**, **quemaduras** e **infecciones** (Figura 20.17*g*). En él se incrementan de modo característico los niveles de cortisol, glucagón, **catecolaminas** y **hormona de crecimiento** en sangre. El paciente es resistente a la insulina. La velocidad del metabolismo basal y los niveles sanguíneos de glucosa y de ácidos grasos libres aumentan. No obstante, la cetogénesis no se acelera, como ocurre en el estado de ayuno. Por causas no del todo bien conocidas, el "pool" o reserva intracelular de glutamina muscular disminuye y esto da lugar a una reducción de la síntesis de proteínas y a un incremento de su destrucción. Puede ser muy difícil revertir esta destrucción de proteínas, aunque actualmente es práctica frecuente reemplazar los aminoácidos, glucosa y triacilgliceroles con disoluciones que se administran por vía intravenosa. No obstante, estas disoluciones carecen de glutamina, tirosina y cisteína debido a las limitaciones de su estabilidad y solubilidad. La administración de estos aminoácidos, quizá mediante el uso en forma de dipéptidos más estables, puede ayudar a revertir el estado catabólico mejor de lo conseguido hasta el momento.

El **balance negativo de nitrógeno** que sufren los pacientes con heridas o infecciones está mediado por proteínas de los monocitos y linfocitos, tales como la **interleuquina 1**, la **interleuquina 6** y el **TNF-α** (véase Apli. Clín. 20.10). Estas citoquinas causan fiebre así como otros diversos cambios metabólicos. La interleuquina-1 aumenta la proteólisis en el músculo esquelético. La interleuquina-6 estimula la síntesis de un conjunto de proteínas hepáticas denominadas reactivos de fase aguda por el hígado. En este grupo de **reactivos de fase aguda** se encuentran el fibrinógeno, proteínas del complemento, algunos factores de coagulación, y α_2-macroglobulina, los cuales desempeñan presumiblemente un papel en la defensa frente a heridas e infecciones. El TNF-α suprime la síntesis de triacilgliceroles en adipocitos, evita la captación de triacilgliceroles circulantes mediante inhibición de la lipoproteína lipasa, estimula la lipólisis, inhibe la liberación de insulina y promueve la resistencia a la insulina. Estas citoquinas parecen ser las responsables de gran parte de la pérdida de masa observada en las infecciones crónicas.

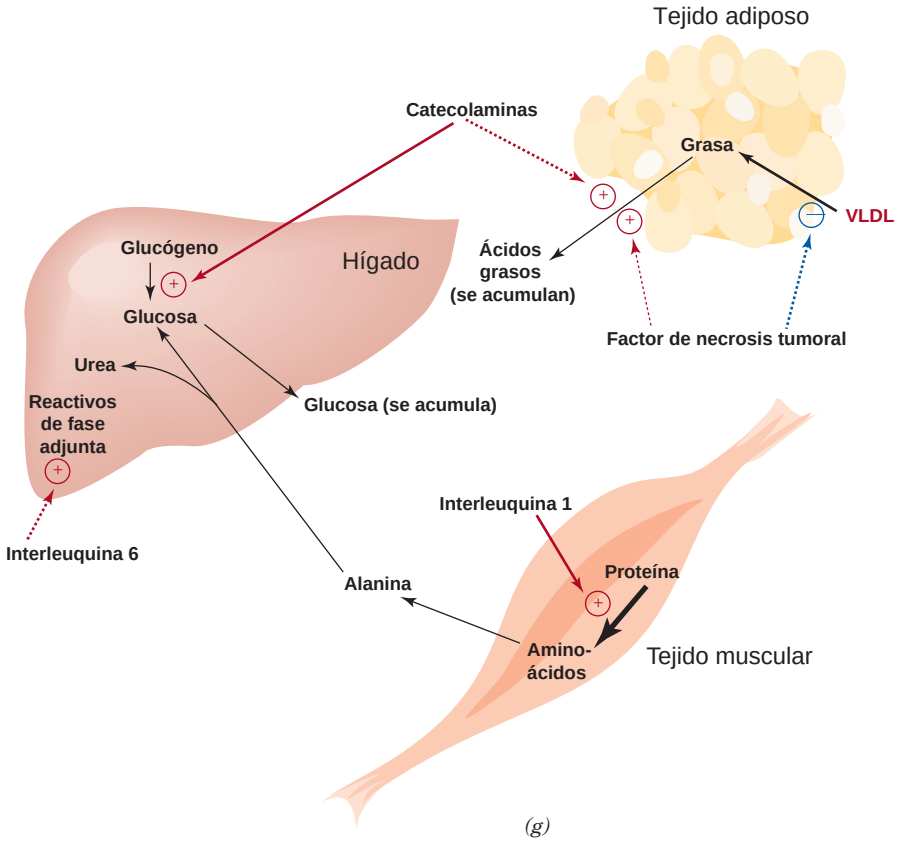
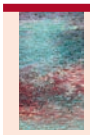


FIGURA 20.17 (continuación)
(*g*) Estrés.

La enfermedad hepática provoca importantes desarreglos metabólicos

Dado que el hígado es un órgano de importancia capital en las interrelaciones metabólicas del cuerpo, las **enfermedades hepáticas** avanzadas pueden estar asociadas con importantes desarreglos metabólicos (Figura 20.17*h*). Las anomalías más importantes se producen en el metabolismo de los aminoácidos. El hígado es el único órgano capaz de **sintetizar urea**. En los pacientes con **cirrosis**, el hígado es



APLICACIÓN CLÍNICA 20.10
Caquexia cancerosa

La pérdida de peso no justificada puede ser un síntoma de malignidad; la pérdida de peso es habitual en cánceres avanzados. La disminución del apetito y de la alimentación contribuyen, pero no son enteramente responsables de la pérdida de peso. La pérdida de peso se produce fundamentalmente en el músculo esquelético y el tejido adiposo, siendo escasa en las proteínas de las vísceras (es decir, hígado, riñón, corazón). Aunque los tumores normalmente manifiestan una glucólisis y liberación de lactato aceleradas, sus necesidades energéticas probablemente no explican la pérdida de peso, ya que ésta puede aparecer incluso con los tumores pequeños. Además, el feto, que es otro órgano en crecimiento que requiere energía, no comporta normalmente la pérdida de peso en la madre gestante. En los pacientes con cáncer se han detectado varias anomalías endocrinas. Estos pacientes tienden a ser resistentes a la insulina, tienen altos niveles de cortisol y poseen un metabolismo basal más activo que los controles para la pérdida de peso. Otros dos fenómenos pueden contribuir a las alteraciones metabólicas. Algunos tumores sintetizan y segregan péptidos biológicamente activos, tales como ACTH, factor de crecimiento nervioso y factores de crecimiento similares a la insulina, los cuales podrían modificar la regulación endocrina del metabolismo energético. Es posible también que la respuesta del huésped a un tumor, por analogía a la infección crónica, conlleve la liberación de interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) por células del sistema inmunitario. Al TNF-α también se le llama caquexina porque produce pérdida de masa. Debido a que los niveles plasmáticos no son elevados, TNF-α e IL-1 pueden actuar de una manera paracrina induciendo la síntesis de IL-6, cuyo nivel es elevado en la sangre de los pacientes caquéxicos. Estas citoquinas inducen fiebre, proteólisis, lipólisis y síntesis de reactivos de fase aguda por el hígado. Parece probable que otras citoquinas adicionales, todavía por caracterizar, jueguen un papel en la caquexia cancerosa y que el mecanismo de este fenómeno pueda variar según los diferentes tipos de tumor.

Beutler, B. y Cerami, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu. Rev. Biochem.* 57:1505, 1988; Tracey, K. J. y Cerami, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 45:491, 1994; Nitenberg, G. y Raynard, B. Nutritional support of the cancer patient: issues and dilemmas. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 34:137, 2000; Tisdale, M. J. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition* 13:1, 1997; y Tisdale, M. J. New cachexic factors. *Curr. Opin. Clin. Metab. Care* 1:253, 1998.

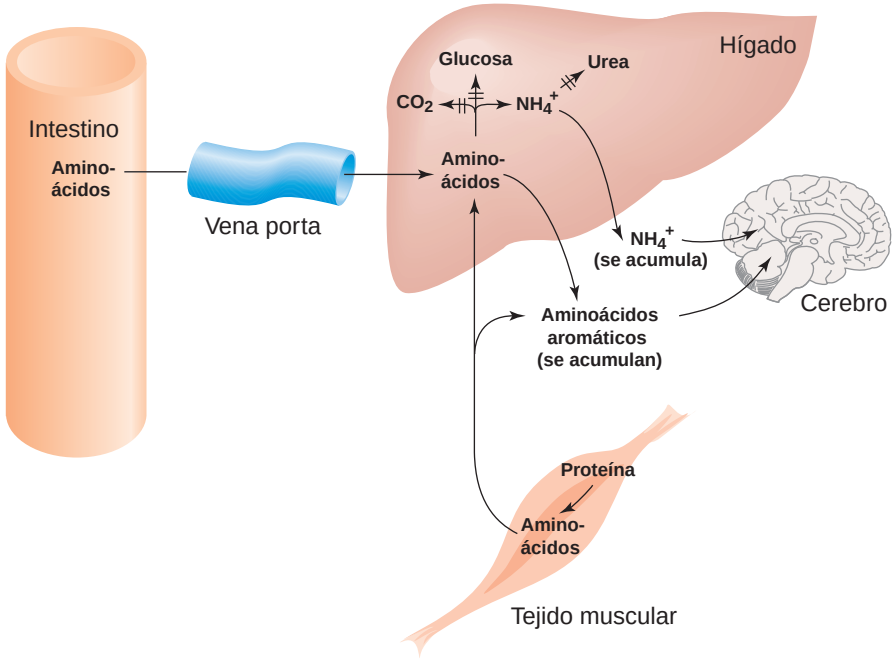


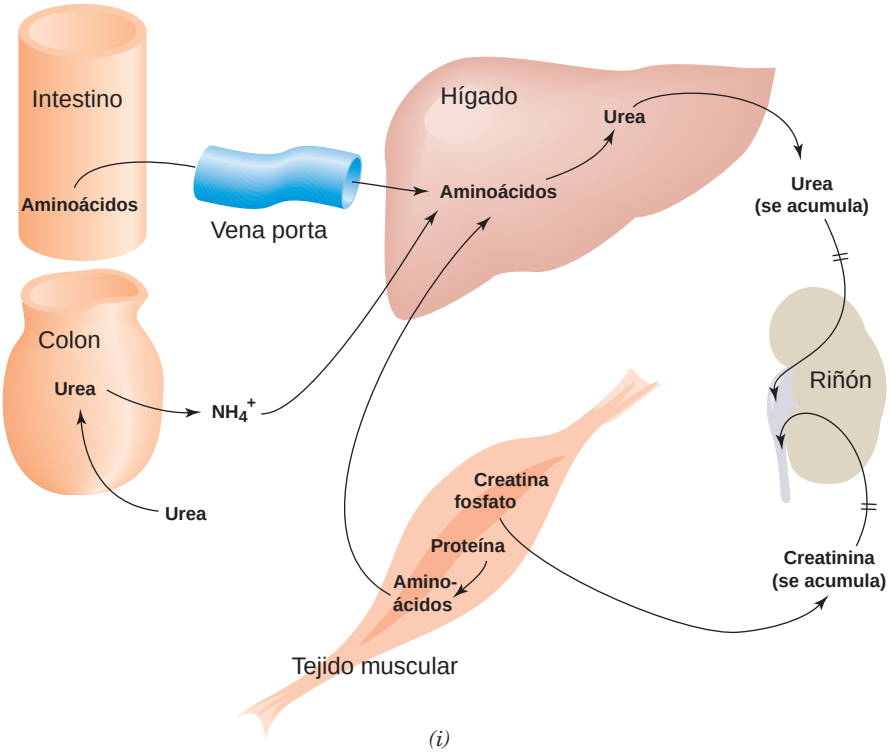
FIGURA 20.17 (continuación)
(*h*) Enfermedad hepática.

incapaz de convertir el amoníaco en urea y glutamina a la velocidad necesaria, de tal forma que la concentración de amoníaco en la sangre aumenta. Este problema es en parte causado por anormalidades en el flujo de sangre a través del hígado cirrótico, lo cual interfiere con el **ciclo de la glutamina** intercelular (véase p. 898). El amoníaco proviene de determinadas reacciones enzimáticas, tales como las de la glutaminasa, glutamato deshidrogenasa y adenosina desaminasa, que se dan durante el metabolismo en el intestino y en el hígado, y lo hace también en la luz intestinal donde la flora bacteriana puede escindir la urea en amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco es muy tóxico para el sistema nervioso central y es la principal causa del estado de coma que a veces desarrollan los pacientes con lesión hepática.

En la enfermedad hepática avanzada, los **aminoácidos aromáticos** se acumulan en la sangre hasta niveles superiores a los de los aminoácidos de cadena ramificada; esto se debe, aparentemente, a un catabolismo hepático defectuoso de los aminoácidos aromáticos. Este hecho es importante porque tanto los aminoácidos aromáticos como los de cadena ramificada se transportan al cerebro mediante el mismo sistema. Una relación de aminoácidos aromáticos a aminoácidos de cadena ramificada elevada en una enfermedad hepática, tiene como resultado un aumento de la absorción cerebral de aminoácidos aromáticos. Esto puede aumentar la síntesis de **neurotransmisores** tales como la **serotonina**, que puede ser responsable de algunos de los problemas neurológicos característicos de la enfermedad hepática. El hígado es asimismo una fuente importante de factor de crecimiento I, parecido a la insulina (IGF-1). Los enfermos de cirrosis sufren una pérdida de masa muscular causada por la síntesis deficiente de IGF-1 en respuesta a la hormona de crecimiento. A menudo muestran resistencia a la insulina y pueden ser diabéticos. Por último, los pacientes con una enfermedad hepática en estado terminal mueren a menudo de hipoglucemia, a causa de la incapacidad del hígado para mantener el nivel de glucosa sanguínea por gluconeogénesis.

En la enfermedad renal se acumulan desechos de nitrógeno

En la enfermedad renal crónica se presentan muchos trastornos del metabolismo del nitrógeno. Los niveles de aminoácidos normalmente metabolizados por el riñón (glutamina, glicina, prolina y citrulina) aumentan. Asimismo, los productos de desecho nitrogenados (p. ej., urea, ácido úrico y creatinina) (Figura 20.17*i*) también se acumulan. Esta acumulación se agrava en caso de ingestión elevada de proteínas o de proteólisis acelerada. En los pacientes renales, el hecho de que las bacterias intestinales puedan escindir la urea liberando amoníaco, y de que el hígado pueda



(i)

FIGURA 20.17 (continuación)
(*i*) Enfermedad renal.

emplear este amoníaco junto con α-cetoácidos para formar aminoácidos no esenciales, ha sido utilizado para controlar los niveles de desechos nitrogenados. Los pacientes se tratan con una dieta rica en glúcidos, mientras que la ingestión de aminoácidos se restringe, en la medida de lo posible a los aminoácidos esenciales. En estas condiciones, el hígado sintetiza los aminoácidos no esenciales a partir de los intermediarios del ciclo de los TCA. Este tipo de dieta terapéutica puede alargar el tiempo que transcurre hasta que el paciente requiera un tratamiento de diálisis.

El etanol se oxida en el hígado alterando la relación NAD^+/NADH

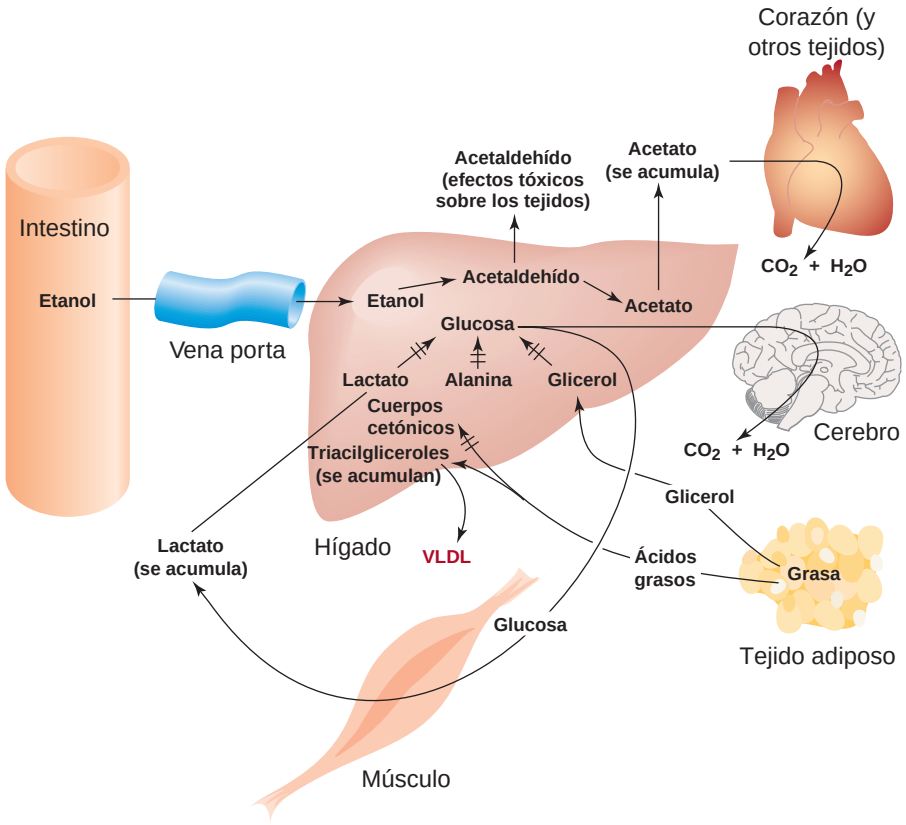
El hígado es responsable principal de las dos primeras etapas del catabolismo del **etanol**:

$$\text{Etanol } (CH_3CH_2OH) + NAD^+ \rightarrow \text{acetaldehído } (CH_3CHO) + NADH + H^+$$

$$\text{Acetaldehído } (CH_3CHO) + NAD^+ + H_2O \rightarrow \text{acetato } (CH_3COO^-) + NADH + H^+$$

El primer paso, catalizado por **alcohol deshidrogenasas**, se da en el citosol y genera NADH; el segundo paso, catalizado por la **aldehído deshidrogenasa**, también produce NADH, pero se produce principalmente en la matriz mitocondrial. El hígado debe eliminar el NADH producido en estas reacciones a través de la única vía que dispone: la cadena mitocondrial de transferencia de electrones. La ingestión de etanol, incluso en cantidades pequeñas, genera demasiado NADH. Muchos enzimas, por ejemplo, varios que están implicados en la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos, son sensibles a inhibición por producto por el NADH. Así pues, durante el metabolismo del alcohol, estas rutas están inhibidas (Figura 20.17*j*), y la hipoglucemia en ayuno y la acumulación de triacilgliceroles hepáticos (hígado graso) son consecuencias de la ingestión de alcohol. El lactato puede acumularse como resultado de la inhibición de la gluconeogénesis láctica pero raramente produce una acidosis metabólica clara.

Las mitocondrias hepáticas poseen una capacidad limitada de oxidar acetato a CO_2 ya que la activación del acetato a acetil CoA requiere GTP, el cual es producido en la reacción de la succinil-CoA sintetasa. El ciclo de los TCA, y por consiguiente la síntesis de GTP, están inhibidos por los niveles elevados de NADH que se producen durante la oxidación del etanol. Una gran parte del acetato formado a partir del etanol pasa del hígado a la sangre. Prácticamente cualquier célula con mitocondrias puede oxidarlo a CO_2 a través del ciclo de los TCA. El acetaldehído, intermediario en



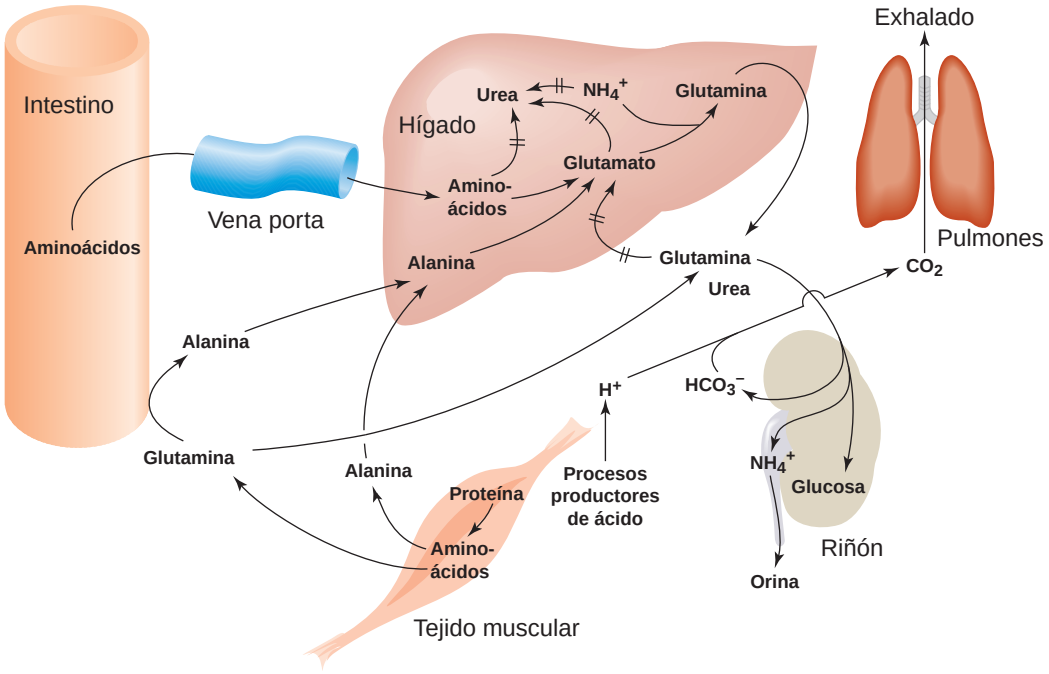
(j)

FIGURA 20.17 (continuación)
(*j*) Ingestión de etanol.

la formación de acetato a partir de etanol, también puede escapar del hígado. El acetaldehído es un compuesto reactivo que forma rápidamente enlaces covalentes con grupos funcionales de compuestos de gran importancia biológica. Se han observado enlaces de este tipo con proteínas en la sangre y tejidos de animales y humanos que beben alcohol. La detección de estos podría proporcionar marcadores sobre hábitos alcohólicos en el pasado de un individuo, del mismo modo que la hemoglobina A_{1c} ha resultado útil como elemento de control de la glucemia en pacientes diabéticos.

La glutamina juega un importante papel en el equilibrio ácido–base

La **regulación del equilibrio ácido–base** es compartida, al igual que la excreción de nitrógeno, por el hígado y el riñón. Aunque el catabolismo completo de la mayor parte de aminoácidos procedentes de las proteínas genera productos neutros (CO_2, H_2O, y urea) no es éste el caso con los aminoácidos cargados (**arginina, lisina** e **histidina**) y los aminoácidos que contienen azufre (**metionina** y **cisteína**), cuyo metabolismo da lugar a la formación neta de protones (ácido). Aunque el metabolismo de los aminoácidos cargados negativamente (**glutamato, aspartato**) tiene como resultado la utilización neta de protones, esto consume y, por tanto equilibra, sólo parte de los protones producidos por el catabolismo de los aminoácidos cargados positivamente y de los que contienen azufre. Por consiguiente, para que el cuerpo permanezca en equilibrio ácido-base, el exceso de protones producido cada día por el catabolismo de las proteínas ha de estar compensado por una cantidad equivalente de base. El papel del riñón en la consecución de este equilibrio es de una importancia crítica. La glutamina, que es fácilmente captada por las células renales, se desamina por la glutaminasa dando glutamato, el cual se desamina oxidativamente por la glutamato deshidrogenasa dando α-cetoglutarato que es convertido por enzimas del ciclo TCA en malato, que a su vez es convertido en glucosa



(k)

FIGURA 20.17 (continuación)
(*k*) Acidosis.

por enzimas de la gluconeogénesis. La suma de todos los pasos revela una producción neta de glucosa y, lo que es más importante, de iones amonio y bicarbonato:

$$\text{glutamina} + 1\tfrac{1}{2}\,O_2 + 3H_2O \rightarrow \tfrac{1}{2}\,\text{Glucosa} + 2HCO_3^- + 2NH_4^+$$

Los iones amonio son transportados al filtrado glomerular mientras que los iones bicarbonato son transportados por la sangre para neutralizar los protones producidos en el catabolismo de los aminoácidos:

$$HCO_3^- + H^+ \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons CO_2 + H_2O$$

El CO_2 producido en esta reacción es exhalado fácilmente por los pulmones, eliminado así de manera efectiva el exceso de ácido producido durante la oxidación de aminoácidos. Este mecanismo adquiere aún mayor importancia en la **acidosis metabólica** (véase Figura 20.17*k*), una situación en la que se produce mucho más ácido en el cuerpo debido a que algún proceso metabólico está fuera de control, por ejemplo, la producción de ácido láctico por la glucólisis anaeróbica o la producción de ácido β-hidroxibutírico por la cetogénesis. En la acidosis metabólica, las actividades glutaminasa, glutamato deshidrogenasa y fosfo*enol*piruvato carboxiquinasa y el transportador mitocondrial de glutamina renales aumentan y se correlacionan con el aumento de gluconeogénesis renal a partir de la glutamina. Esto es debido a que se dan cambios adaptativos en las cantidades de estos enzimas en el riñón que aumentan mucho la capacidad del riñón para sintetizar glucosa a partir de glutamina a través de la vía antes descrita. La consecuencia es un incremento de la excreción urinaria de iones amonio y una mayor generación de ion bicarbonato para la neutralización del ácido que se está produciendo. El hígado contribuye en esta situación sintetizando menos urea, haciendo, de este modo, que haya más glutamina disponible para el riñón. En la **alcalosis** ocurre lo opuesto; la síntesis hepática de urea aumenta, mientras que la gluconeogénesis y la excreción de ion amonio (y la generación de bicarbonato) renal disminuyen.

La existencia de un ciclo intercelular de la glutamina es una característica importante que capacita al hígado para desempeñar un papel central en la regulación del pH sanguíneo. El hígado está formado por dos tipos de hepatocitos que están implicados de manera singular en el metabolismo de la glutamina: los **hepatocitos periportales**, próximos a la arteriola hepática y a la vénula porta, y los **hepatoci-**

tos perivenosos, localizados cerca de la vénula central (Figura 20.18). La sangre entra en el hígado a través de la arteria hepática y la vena porta, y lo abandona por la vena central. La glutaminasa y los enzimas del ciclo de la urea se concentran en los hepatocitos periportales, mientras que la glutamina sintetasa se encuentra exclusivamente en los hepatocitos limpiadores perivenosos (véase p. 784). La glutamina penetra en las células periportales y se hidroliza, proporcionando ion amonio para la síntesis de urea. La mayor parte de glutamina y de nitrógeno en forma de amonio que entran en el hígado lo abandonan en forma de urea. La localización de la glutamina sintetasa en los hepatocitos perivenosos es importante, ya que algunos iones amonio escapan a la conversión en urea. Este enzima capta una gran parte de este compuesto tóxico en forma de glutamina. La glutamina se libera de las células perivenosas limpiadoras a la sangre y retorna al hígado donde vuelve a entrar en el ciclo de la glutamina en los hepatocitos periportales. Por consiguiente, para el mantenimiento de niveles sanguíneos bajos de amonio en el hígado, son importantes tanto la donación de ion amonio por la glutamina para la síntesis de urea, como la síntesis de glutamina. En condiciones de acidosis, gran parte de la glutamina circulante escapa a la hidrólisis en el hígado porque la captación de glutamina (transporte) por los hepatocitos y la actividad glutaminasa están inhibidas por un descenso del pH sanguíneo. Del mismo modo, la carbamil fosfato sintetasa de los hepatocitos periportales es menos activa cuando disminuye el pH de la sangre, limitando así la síntesis de urea. Esto permite a las células perivenosas limpiadoras una mayor conversión del ion amonio en glutamina, la cual, junto con una menor captación de glutamina por las células periportales, hace que haya más glutamina disponible para la producción de ion bicarbonato por los riñones para neutralizar el ácido producido por un proceso metabólico fuera de control.

El colon recupera energía de la dieta

A diferencia del intestino delgado, que utiliza glutamina como principal fuente de energía, el **colon** utiliza **ácidos grasos de cadena corta: butirato**, **propionato**, **isobutirato** y **acetato** (Figura 20.19). El colon obtiene la mayor parte de estos ácidos grasos de la luz del colon, donde son producidos por la flora bacteriana por fermentación de componentes de la dieta no absorbidos. Estos ácidos grasos de cadena

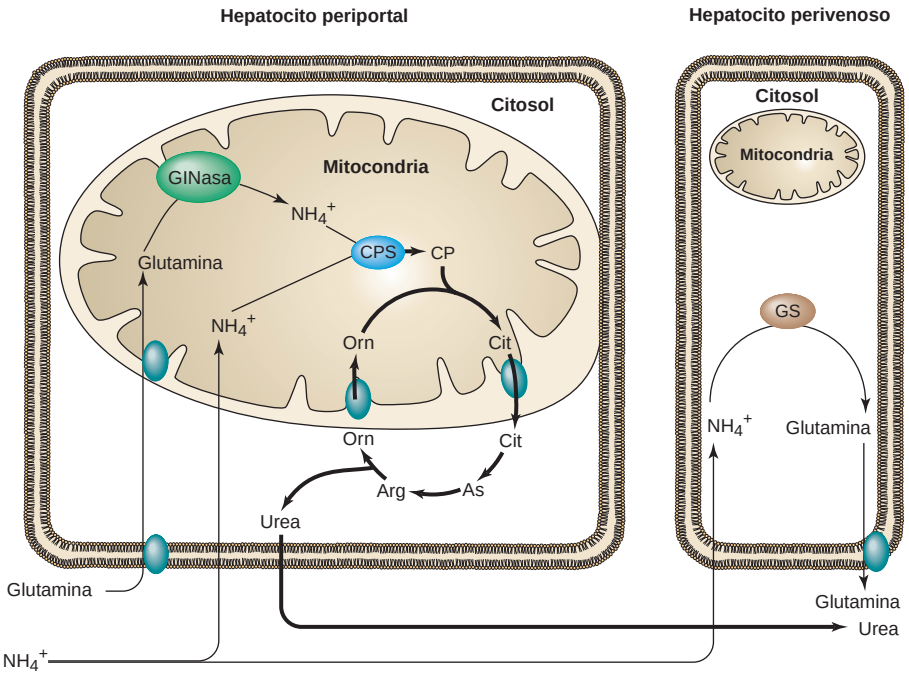


FIGURA 20.18
Ciclo intercelular de la glutamina en el hígado.
Abreviaturas: GlNasa, glutaminasa; GS, glutamina sintetasa; CPS, carbamil fosfato sintetasa I; CP, carbamil fosfato; Cit, citrulina; AS, argininosuccinato; Arg, arginina; Orn, ornitina.
Adaptado de Häussinger, D. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. *72:43, 1998.*

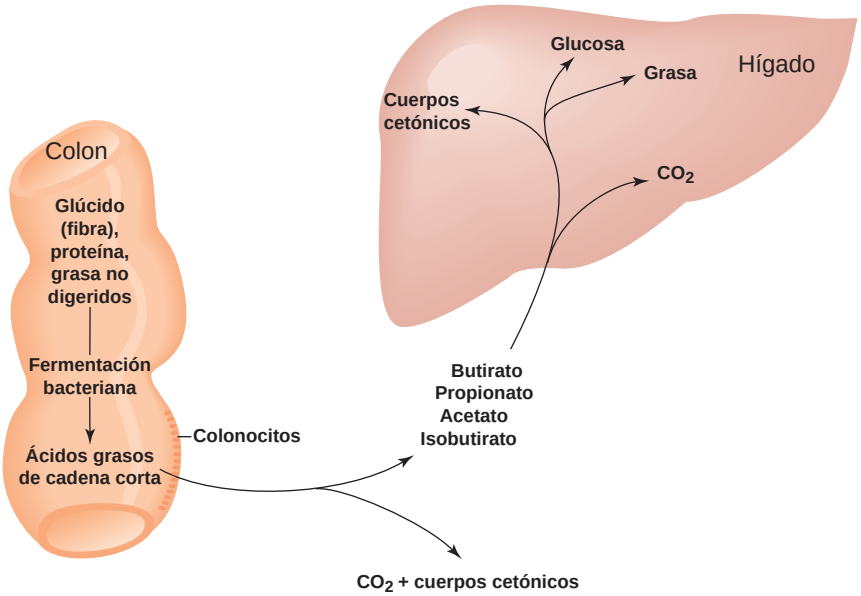


FIGURA 20.19
La fermentación bacteriana genera combustible para los colonocitos.

corta se perderían con las heces por lo que de esta manera su utilización por las células del colon (colonocitos) representa un sistema para obtener la mayor energía posible procedente de la dieta. Si se producen en exceso respecto a las necesidades del colon, los ácidos grasos de cadena corta pasan a la sangre portal para su utilización por el hígado. Resulta interesante que los colonocitos puedan producir cuerpos cetónicos a partir de butirato y que probablemente los liberen a la sangre portal para su utilización como combustible por los tejidos extrahepáticos. Cuando se realiza una cirugía de *by-pass* de colon (p. ej., ileostomía), algunos pacientes desarrollan una forma de **colitis** denominada colitis de desviación. En algunos casos, la colitis se ha curado mediante enemas que contienen ácidos grasos de cadena corta.

BIBLIOGRAFÍA

Amiel, S. A. Organ fuel selection: brain. *Proc. Nutr. Soc.* 54:151, 1995.

Brownlee, M., Vlassara, H. y Cerami, A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetes complications. *Ann. Intern. Med.* 101:527, 1984.

Calder, P. C. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 54:65, 1995.

Cerami, A. y Koenig, R. H. Hemoglobin A_{1c} as a model for the development of the sequelae of diabetes mellitus. *Trends Biochem. Sci.* 3:73, 1978.

Cohen, P. y Cohen, P. T. W. Protein phosphatases come of age. A review. *J. Biol. Chem.* 264:21435, 1989.

Crabb, D. W. y Lumeng, L. Metabolism of alcohol and the pathophysiology of alcoholic liver disease. En: G. Gitnick (Ed.), *Principles and Practice of Gastroenterology and Hepatology.* New York: Elsevier, 1988, p. 1163.

Curthoys, N. P. y Watford, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 15:133, 1995.

DeLeve, L. D. y Kaplowitz, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 52:287, 1991.

Duée, P.-H., Darcy-Vrillon, B., Blachier, F. y Morel, M.-T. Fuel selection in intestinal cells. *Proc. Nutr. Soc.* 54:83, 1995.

Elia, M. General integration and regulation of metabolism at the organ level. *Proc. Nutr. Soc.* 54:213, 1995.

Fulop, M. Alcoholism, ketoacidosis, and lactic acidosis. *Diabetes Metab. Rev.* 5:365, 1989.

Frayn, K. N., Humphreys, S. M. y Coppack, S. W. Fuel selection in white adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 54:177, 1995.

Geelen, M. J. H., Harris, R. A., Beynen, A. C. y McCune, S. A. Short-term hormonal control of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 29:1006, 1980.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B. y Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103:1489, 1999.

Harris, R. A., Huang, B. y Wu, P. Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Adv. Enzyme. Regul.* 41:269, 2001.

Häussinger, D. Hepatic glutamine transport and metabolism. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 72:43, 1998.

Henriksson, J. Muscle fuel selection: effect of exercise and training. *Proc. Nutr. Soc.* 54:125, 1995.

Hers, H. G. y Hue, L. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 52:617, 1983.

Horton, J. D., Bashmakov, Y., Shimomura, I. y Shimano, H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5987, 1998.

Katz, J. y McGarry, J. D. The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism? *J. Clin. Invest.* 74:1901, 1984.

Krebs, H. A. Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals. *Adv. Enzyme Regul.* 10:387, 1972.

Krebs, H. A., Williamson, D. H., Bates, M. W., Page, M. A. y Hawkins, R. A. The role of ketone bodies in caloric homeostasis. *Adv. Enzyme Regul.* 9:387, 1971.

Kurkland, I. J. y Pilkis, S. J. Indirect and direct routes of hepatic glycogen synthesis. *FASEB J.* 3:2277, 1989.

Lecker, S. H., Solomon, V., Mitch, W. E. y Goldberg, A. L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin–proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* 129:227S, 1999.

MacDonald, I. A. y Webber, J. Feeding, fasting and starvation: factors affecting fuel utilization. *Proc. Nutr. Soc.* 54:267, 1995.
McGarry, J. D. y Brown, N. F. The mitochondrial carnitine-palmitoyl-CoA transferase system. *Eur. J. Biochem.* 244:1, 1997.
Newsholme, E. A. y Leech, A. R. *Biochemistry for the Medical Sciences.* New York: Wiley, 1983.
Nosadini, R., Avogaro, A., Doria, A., Fioretto, P., Trevisan, R. y Morocutti, A. Ketone body metabolism: a physiological and clinical overview. *Diabetes Metab. Rev.* 5:299, 1989.
Ookhtens, M. y Kaplowitz, N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin. Liver Dis.* 18:313, 1998.
Pedersen, O. The impact of obesity on the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a review of current hypotheses. *Diabetes Metab. Rev.* 5:495, 1989.
Pedersen, O. y Beck-Nielsen, H. Insulin resistance and insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 10:516, 1987.
Pilkis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J. y Lange, A. J. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 64:799, 1995.
Randle, P. J. Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level. *Proc. Nutr. Soc.* 54:317, 1995.
Ruderman, N. B., Saha, A. K., Vavvas, D. y Witters, L. A. Malonyl CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 276:E1, 1999.
Shulman, G. I. y Landau, B. R. Pathways of glycogen repletion. *Physiol. Rev.* 72:1019, 1992.
Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S. y Lazar, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307, 2001.
Sugden, M. C., Holness, M. J. y Palmer, T. N. Fuel selection and carbon flux during the starved-to-fed transition. A review article. *Biochem. J.* 263:313, 1989.
Taylor, S. I. Diabetes mellitus. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, y D. Vallee, (Eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
Toth, B., Bollen, M. y Stalmans, W. Acute regulation of hepatic phosphatases by glucagon, insulin, and glucose. *J. Biol. Chem.* 263:14061, 1988.
Ulwin, P. The state of world hunger. *Nutr. Rev.* 52:151, 1994.
Williamson, D. H. y Lund, P. Substrate selection and oxygen uptake by the lactating mammary gland. *Proc. Nutr. Soc.* 54:165, 1995.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. El hecho de que la K_m de las aminotransferasas para los aminoácidos sea mucho mayor que la de las aminoacil-tRNA sintetasas significa que:
   A. a bajas concentraciones de aminoácidos, la síntesis de proteínas tendrá preferencia sobre el catabolismo de los aminoácidos.
   B. el hígado no puede acumular aminoácidos.
   C. los aminoácidos sufren transaminación en cuanto llegan al hígado.
   D. cualquier aminoácido que se encuentre en exceso con respecto a las necesidades inmediatas de obtener energía se incorporará a las proteínas.
   E. los aminoácidos sólo se pueden catabolizar si se hallan presentes en la dieta.

2. En el estado temprano de renutrición:
   A. aumenta la concentración de los ácidos grasos de la sangre.
   B. continúa la glucogenólisis en el hígado para mantener los niveles de glucosa sanguínea.
   C. el hígado recupera su glucógeno mediante síntesis de glucosa 6-fosfato a partir de lactato.
   D. la glucosa absorbida del intestino se utiliza principalmente para la síntesis de ácidos grasos por el hígado.
   E. no pueden utilizarse los aminoácidos para la síntesis de proteínas.

3. La carnitina:
   A. se forma en todas las células para su propio consumo.
   B. se sintetiza directamente a partir de lisina libre.
   C. su formación requiere que los residuos de lisina de una proteína sean metilados por la *S*-adenosilmetionina.
   D. su formación es inhibida por la vitamina C.
   E. se escinde a γ-butirobetaína.

4. La mayor reserva de energía (en kilocalorías) en el cuerpo humano es:
   A. la glucosa sanguínea.
   B. el glucógeno hepático.
   C. el glucógeno muscular.
   D. los triacilgliceroles del tejido adiposo.
   E. la proteína muscular.

5. Todo lo siguiente representa el control de un proceso metabólico por la disponibilidad de sustrato EXCEPTO:
   A. el aumento en la síntesis de urea que sigue a la ingestión de una comida rica en proteínas.
   B. la velocidad de cetogénesis.
   C. la hipoglucemia de la inanición avanzada.
   D. la respuesta de la glucólisis a la fructosa 2,6-bisfosfato.
   E. la síntesis de sorbitol.

6. La conversión de enzimas hepáticos metabólicamente importantes de su forma no fosforilada a la forma fosforilada:
   A. siempre activa el enzima.
   B. siempre está catalizada por una proteína quinasa dependiente de cAMP.
   C. está señalizada por la insulina.
   D. es más probable que ocurra en el estado de ayuno que en el de buena nutrición.
   E. habitualmente tiene lugar en los residuos de treonina de la proteína.

7. La modificación del nivel de actividad enzimática por variación en el número de las moléculas de enzima:
   A. es considerablemente más lento que los métodos de modificación alostérica o covalente.
   B. puede implicar la inducción de enzimas.
   C. puede anular la efectividad del control alostérico.
   D. puede ser provocado por influencias hormonales o por variación del estado nutricional.
   E. todo lo anterior es correcto.

8. El metabolismo muscular durante el ejercicio:
   A. es el mismo si el ejercicio es aeróbico o anaeróbico.
   B. pasa a utilizar fundamentalmente ácidos grasos en lugar de glucosa como combustible, si éste es aeróbico.
   C. en estado aeróbico emplea fundamentalmente glucógeno y fosfocreatina.
   D. provoca un incremento brusco en la concentración de cuerpos cetónicos en sangre.
   E. en el estado anaeróbico utiliza únicamente fosfocreatina.

9. En la diabetes mellitus tipo 2 (no dependiente de insulina):
   A. no se produce hipertrigliceridemia.
   B. la cetoacidosis se presenta siempre si no se trata.
   C. las células β del páncreas ya no pueden sintetizar insulina.
   D. puede estar acompañada de niveles elevados de insulina en la sangre.
   E. causa una fuerte pérdida de peso.

10. La glutaminasa:
   A. no está afectada por el pH sanguíneo en las células renales.
   B. está confinada a los hepatocitos perivenosos en el hígado.
   C. necesita ATP para la reacción que cataliza.
   D. es más activa en el hígado en condiciones de acidosis.
   E. aumenta en las células renales en condiciones de acidosis.

Preguntas 11 y 12: La malnutrición proteica y calórica son dos importantes problemas nutricionales, especialmente entre los niños. Ambas aparecen a menudo en los países en desarrollo cuando el niño es destetado.La malnutrición proteica, el kwashiorkor, aparece cuando se alimenta al niño con una dieta adecuada en cuanto a calorías (la mayor parte glúcidos) pero deficiente en proteína. La ingestión calórica inadecuada se denomina marasmo. En el kwarshiorkor los niveles de insulina son elevados y existe grasa subcutánes. Los niños con poco peso respecto a la altura pueden recuperarse bien cuando se les alimenta adecuadamente mientras que no es así para los que tienen la situación inversa. Los niños con marasmo carecen de grasa subcutánea.

11. El tejido adiposo responde a una relación insulina/glucagón baja mediante:
   A. la desfosforilación de los enzimas interconvertibles.
   B. la estimulación de la deposición de grasas.
   C. el incremento de la cantidad de piruvato quinasa.
   D. la estimulación de la lipasa sensible a la hormona.
   E. la estimulación de la fenilalanina hidroxilasa.

12. ¿Cuál de los siguientes fenómenos favorecería a la gluconeogénesis en estado de ayuno?
   A. la estimulación de la piruvato quinasa por la fructosa 1,6-bisfosfato.
   B. la activación de la piruvato carboxilasa por el acetil CoA.
   C. la activación de la acetil-CoA carboxilasa por citrato.
   D. la inhibición de la carnitina palmitil transferasa I por el malonil CoA.
   E. la estimulación de la 6-fosfofructo-1-quinasa por la fructosa 2,6-bisfosfato.

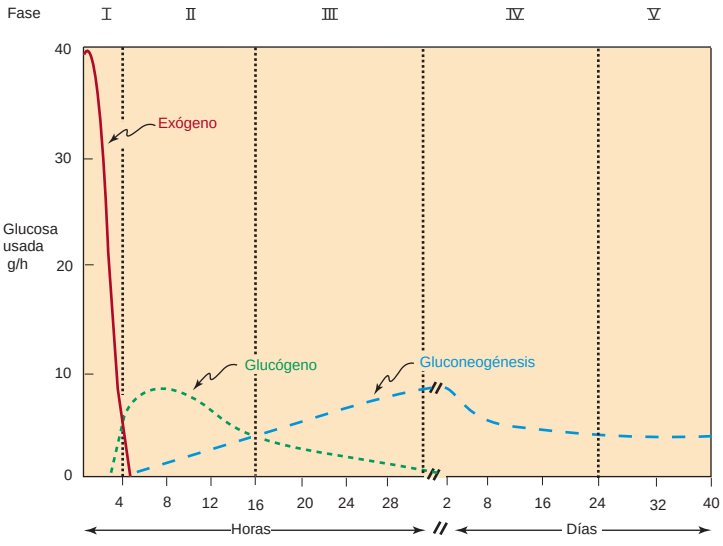
Preguntas 13 y 14: el síndrome de Reye es una enfermedad de los niños grave aunque rara hoy en día. Se relacionó la utilización de aspirina por niños con varicela al desarrollo de la enfermedad por lo que se avisa a los padres que no den aspirina a los niños con enfermedades víricas. El síndrome de Reye, que lesiona las mitocondrias hepáticas, se caracteriza por disfunción cerebral (irritabilidad, letargia y coma) y disfunción hepática (cantidad elevada de ácidos grasos libres en el plasma, hígado graso, hipoglucemia, hiperamonemia y acumulación de ácidos orgánicos de cadena corta). Las mitocondrias deterioradas pueden dañar la oxidación de ácidos grasos, la síntesis de carbamil fosfato y de ornitina para la destoxificación del amoníaco y la síntesis de oxalacetato para la gluconeogénesis. Parte de la terapia consiste en la administración de glucosa intravenosa la cual, entre otras cosas, reduce la proteólisis muscular y, por tanto, produce menos aminoácidos que han de ser, en último término, desaminados.

13. Todas las afirmaciones siguientes acerca de las interacciones entre órganos son correctas EXCEPTO:
   A. la ornitina para el ciclo de la urea se sintetiza a partir del glutamato en el riñón.
   B. la citrulina es un precursor de la síntesis de arginina en el riñón.
   C. el riñón utiliza la arginina en la síntesis de creatina para el músculo.
   D. la arginina sintetizada por el riñón es la fuente de óxido nítrico para muchos tipos celulares.
   E. la creatinina eliminada por el riñón se genera en el músculo a partir de creatina fosfato.

14. La proteólisis muscular libera, entre otros, aminoácidos de cadena ramificada. Los aminoácidos de cadena ramificada:
   A. también pueden sintetizarse a partir de la alanina.
   B. pueden ser catabolizados por el músculo, pero no por el hígado.
   C. son los principales aminoácidos presentes en la dieta que son metabolizados por el intestino.
   D. promueven la fosforilación del complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa.
   E. constituyen una fuente principal de nitrógeno para la alanina y glutamina producidas en el músculo.

Problemas

15.



¿Qué cambios metabólicos y hormonales han tenido lugar que justifiquen el descenso de la gluconeogénesis en la fase IV del diagrama anterior de las cinco fases de la homeostasis de la glucosa en el hombre?

16. ¿Por qué la determinación de la hemoglobina A_{1c} es una medida mejor del status de la glucosa sanguínea de un diabético que la determinación diaria de la glucosa en sangre?

RESPUESTAS

2. **A** Una K_m elevada significa que la reacción transcurrirá lentamente a concentración baja, mientras que una K_m baja significa que en las mismas circunstancias la reacción será rápida. La síntesis de proteínas sólo requiere que estén presentes todos los aminoácidos. El hígado no cataboliza los aminoácidos a menos que su concentración sea elevada. C: Una K_m elevada requiere una mayor concentración de sustrato para una actividad rápida.

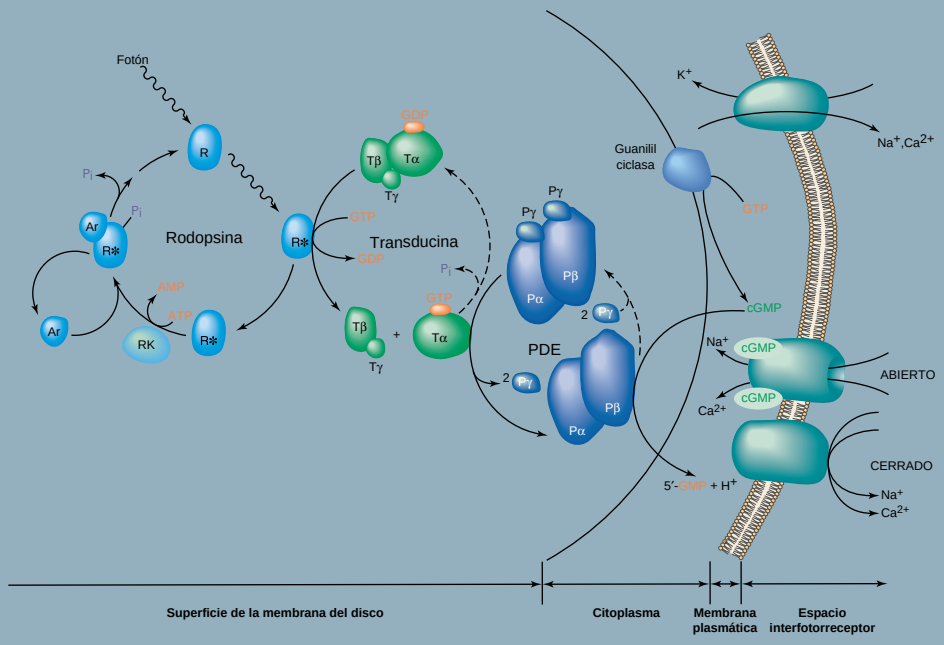
2. **C** Esta es la ruta indirecta. A: Caso de que hubiese algún cambio, la concentración disminuiría debido a una menor lipólisis en el tejido adiposo. B: La glucosa que proviene del intestino pro-

porciona la glucosa sanguínea. D: Los aminoácidos pueden utilizarse para la síntesis de proteína en este estado.

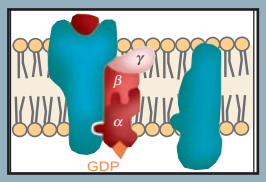
3. **C** Estas trimetil-lisinas son liberadas cuando se hidroliza la proteína. A: Sólo el hígado y el riñón poseen la ruta sintética completa. B: La lisina ha de estar primeramente presente en la proteína celular. D: Hay dos hidroxilaciones que requieren esta vitamina. E: Este es un precursor.
4. **D** El contenido calórico de la grasa del tejido adiposo es más de 5 veces superior al de la proteína muscular, y 200 veces mayor que el de todos los glúcidos en su conjunto. A: La glucosa sanguínea debe conservarse, pero en sí es una reserva energética minoritaria. B y C: El glucógeno es una reserva de energía de rápida movilización, pero no es muy grande. E: Las proteínas se pueden utilizar para obtener energía, pero éste no es su papel fundamental.
5. **D** La fructosa 2,6-bisfosfato es un efector alostérico (activa a la quinasa e inhibe a la fosfatasa) del enzima que controla la glucólisis. A: Después de la ingestión de una comida rica en proteínas, el intestino produce amoníaco y precursores de la ornitina para la síntesis de urea. B: La cetogénesis depende de la disponibilidad de ácidos grasos. C: Esto representa la falta de sustratos gluconeogénicos. E: Esto da lugar a complicaciones de la diabetes.
6. **D** En el estado de buena nutrición, la relación insulina/glucagón es elevada y los niveles de cAMP son bajos. A: Algunos enzimas son activos si están fosforilados, mientras que en otros casos ocurre lo contrario. B: Este es el mecanismo de fosforilación más habitual, aunque no el único. C: El glucagón señala la fosforilación de los enzimas hepáticos al elevar cAMP. E: El lugar más habitual de fosforilación es la serina.
7. **E** A: Los cambios adaptativos son ejemplos de control a largo plazo. B y D: En la inducción de ciertos enzimas y/o en la alteración de su velocidad de degradación están implicados tanto efectos hormonales como nutricionales. C: Si, a causa de efectos adaptativos, la cantidad existente de un enzima es nula o muy pequeña, el control alostérico es irrelevante. Es importante tener en cuenta este hecho cuando se repone la alimentación a una persona en estado de inanición.
8. **B** El descenso del cociente respiratorio indica que esto es así. A: Los músculos anaeróbicos emplean glucosa de forma casi exclusiva; los músculos aeróbicos emplean ácidos grasos y cuerpos cetónicos. D: Los cuerpos cetónicos son buenos sustratos aeróbicos, por lo que su concentración en la sangre no aumenta mucho. E: La fosfocreatina es solamente una fuente de ATP a corto plazo.
9. **D** El problema es la resistencia a la insulina, no la imposibilidad completa de producir insulina. A: La hipertrigliceridemia es característica. B: La cetoacidosis sólo es normal en el tipo dependiente de insulina. C: Véase la respuesta correcta. E: La mayoría de los pacientes son obesos y permanecen obesos.
10. **E** La actividad glutaminasa está elevada en el riñón durante la acidosis como primer paso en la generación de bicarbonato para neutralizar el exceso de ácido. A: Véase el comentario anterior. B: Este es el lugar de síntesis de glutamina. C: La glutamina sintetasa requiere ATP; la glutaminasa cataliza la simple hidrólisis de la glutamina a glutamato y amoníaco. D: El menor flujo a través de la glutaminasa hepática durante la acidosis permite a la glutamina escapar del hígado para su utilización en el riñón
11. **D** A: Una relación insulina/glucagón baja, significa que los niveles de cAMP son elevados y, en consecuencia, la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP y la fosforilación de proteínas serán elevadas. B y D: La fosforilación activa a la lipasa sensible a hormona para movilizar las grasas. C: El cAMP actúa estimulando la modificación covalente de enzimas. E: Este enzima es hepático.
12. **B** La piruvato carboxilasa es un enzima gluconeogénico clave. A y E: La estimulación de estos enzimas estimula la glucólisis y reprime la gluconeogénesis. C y D: El malonil CoA inhibe el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria para la β-oxidación, una fuente de energía necesaria para la gluconeogénesis.
13. **A** El riñón carece de los enzimas necesarios para convertir el glutamato en el semialdehído del glutamato. B: Esto es verdadero tanto en riñón como en el hígado. C: La reacción requiere *S*-adenosilmetionina. E: La creatinina constituye una medida de la masa muscular y de la función renal.
14. **E** Cuando se forman aminoácidos de cadena ramificada a partir de las proteínas musculares, su nitrógeno se transfiere por transaminación a la alanina o la glutamina, las cuales son transportadas al hígado y al riñón. A: Los aminoácidos de cadena ramificada son aminoácidos esenciales que se han de suministrar a través de la dieta y que no pueden ser sintetizados a partir de otros aminoácidos. B: El músculo presenta elevados niveles de aminotransferasas para los aminoácidos de cadena ramificada, mientras que el hígado posee grandes cantidades de los enzimas para el catabolismo de los α-cetoácidos de cadena ramificada. C: El intestino metaboliza varios aminoácidos de la dieta, pero no éstos. D: Los cetoácidos de cadena ramificada obtenidos por transaminación de los aminoácidos de cadena ramificada inhiben la quinasa de la deshidrogenasa de α-cetoácidos de cadena ramificada y, por tanto, impiden la fosforilación del complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa.
15 En la fase IV la mayoría de tejidos utilizan principalmente ácidos grasos y cuerpos cetónicos como combustible. La concentración de cuerpos cetónicos es ahora suficientemente alta de modo que pueden entrar en el cerebro y suministrar una cantidad significativa de energía. Esto reduce las necesidades de glucosa. La baja razón insulina/glucagón estimula la lipólisis y la gluconeogénesis. La oxidación incrementada de ácidos grasos en el hígado aumenta el nivel de acetil CoA y de NADH. La elevada NADH inhibe alostéricamente el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el acetil CoA que se acumula se transforma en cuerpos cetónicos. La baja razón insulina/glucagón también disminuye el catabolismo de la proteína muscular, que es la fuente principal de sustrato para la gluconeogénesis. La disminución de la gluconeogénesis conserva la proteína durante un período de tiempo más largo.
16 Una determinación simple de glucosa, incluso si se hace diariamente, mide la concentración de glucosa sanguínea sólo en un momento determinado. Los niveles de glucosa en sangre varían a lo largo del día con cosas tales como la ingesta de alimento, ejercicio y estado emocional. La hemoglobina A_{1c} es el resultado de la reacción no enzimática entre la glucosa y la valina aminoterminal de la cadena-β de la hemoglobina. La concentración de hemoglobina A_{1c} se correlaciona con la concentración media de glucosa en sangre durante un período de varias semanas (tres meses, que es la vida media de un eritrocito).

PARTE V

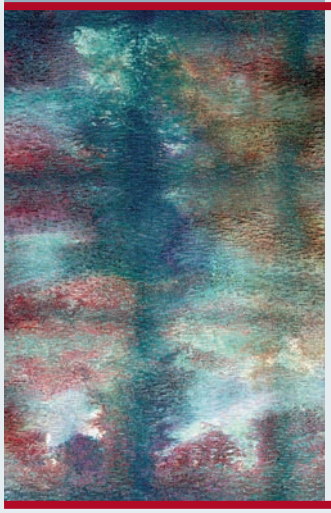
PROCESOS FISIOLÓGICOS



Muchas de las reacciones que aparecen en la parte IV se dan tanto en procariotas como en eucariotas. Los organismos superiores, incluidos los humanos, han desarrollado una serie de funciones especializadas que van desde la conducción de impulsos eléctricos a lo largo de una fibra nerviosa a procesos especializados para la digestión y absorción del alimento. Estos procesos cuando se dan en los animales se conocen como procesos fisiológicos. La figura de la parte superior representa uno de estos procesos, la bioquímica de la visión, cuyos detalles se muestran en la Figura 23.25. Los procesos fisiológicos requieren coordinación, ya que a menudo intervienen diferentes células y órganos. Las hormonas son los mensajeros que transmiten instrucciones entre células y tejidos. En esta parte se describen en primer lugar las principales clases de hormonas seguido de la descripción de procesos fisiológicos importantes. La Parte V concluye con capítulos acerca de nuestras necesidades nutricionales.



21



BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS I: HORMONAS POLIPEPTÍDICAS

Gerald Litwack y Thomas J. Schmidt

21.1 VISIÓN GENERAL 906

21.2 HORMONAS Y SISTEMA DE CASCADA HORMONAL 907
El sistema en cascada amplifica una señal específica 907
Hormonas polipeptídicas de la hipófisis anterior 910

21.3 HORMONAS POLIPEPTÍDICAS PRINCIPALES Y SU ACCIÓN 912

21.4 GENES Y FORMACIÓN DE HORMONAS POLIPEPTÍDICAS 915
La proopiomelanocortina es un polipéptido precursor de ocho hormonas 915
Muchas hormonas polipeptídicas están codificadas por un solo gen 915
Un solo gen puede codificar múltiples copias de una hormona 918

21.5 SÍNTESIS DE HORMONAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS 919
La adrenalina se sintetiza a partir de fenilalanina/tirosina 919
La síntesis de hormona tiroidea requiere la incorporación de yodo en una tirosina de la tiroglobulina 919

21.6 INACTIVACIÓN Y DEGRADACIÓN DE HORMONAS 923

21.7 REGULACIÓN CELULAR Y SECRECIÓN HORMONAL 925
Las proteínas G actúan como transductores celulares de la señal hormonal 925
El AMP cíclico activa la ruta de la proteína quinasa A 928
La formación de inositol trisfosfato conduce a la liberación de calcio a partir de reservas intracelulares 928
El diacilglicerol activa la ruta de la proteína quinasa C 931

21.8 SISTEMAS CÍCLICOS DE CASCADA HORMONAL 931
La síntesis de melatonina y serotonina está controlada por ciclos de luz y oscuridad 932
El ciclo del ovario está controlado por la hormona liberadora de gonadotropina 932
Ausencia de fertilización 934
Fertilización 936

21.9 INTERACCIONES HORMONA–RECEPTOR 936
El análisis de Scatchard permite determinar el número de sitios de unión del receptor y la constante de asociación para el ligando 937
En algunas interacciones hormona–receptor intervienen múltiples subunidades hormonales 939

21.10 ESTRUCTURA DE RECEPTORES: EL RECEPTOR β-ADRENÉRGICO 940

21.11 INTERNALIZACIÓN DE RECEPTORES 941
La clatrina forma un entramado estructural para dirigir la internalización de los complejos hormona–receptor desde la membrana plasmática 941

21.12 ACCIÓN INTRACELULAR: PROTEÍNA QUINASAS 943
El receptor de insulina: transducción a través de tirosina quinasa 944
Actividad de la vasopresina: proteína quinasa A 945
Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH): proteína quinasa C 948
Actividad del factor atrionatriurético (ANF): proteína quinasa G 950

21.13 ONCOGENES Y FUNCIONES DE LOS RECEPTORES 952

BIBLIOGRAFÍA 955
PREGUNTAS 955
RESPUESTAS 957
APLICACIONES CLÍNICAS
21.1 Ensayos de la actividad de la hipófisis anterior 910
21.2 Hipopituitarismo 912
21.3 Tratamiento de la enfermedad maníaco-depresiva con litio: ciclo del fosfatidilinositol 931
21.4 Disminución de la actividad quinasa del receptor de la insulina en la diabetes mellitus gestacional 946
21.5 Avances en la quimioterapia del cáncer de mama 955

21.1 VISIÓN GENERAL

Las células están reguladas por muchas hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y determinadas toxinas a través de interacciones de estos distintos ligandos con sus **receptores específicos** localizados en la superficie celular. Este conjunto de receptores es el mecanismo principal por el que las **hormonas peptídicas** y las **hormonas derivadas de aminoácidos** ejercen su acción a nivel celular. Otro mecanismo consiste en la permeabilización de la membrana celular mediante **hormonas esteroides** que a continuación interaccionan con sus receptores intracelulares específicos (véase el Capítulo 22). Es principalmente en estos dos sitios, la membrana celular y el medio intracelular, donde se produce la interacción inicial de los ligandos con los receptores celulares, tal como muestra el esquema de la Figura 21.1. Las hormonas polipeptídicas y varias hormonas derivadas de aminoácidos se unen a receptores específicos de la membrana celular. La hormona tiroidea es una excepción, la cual se une a un receptor que se encuentra en el núcleo y se asemeja a algunos receptores de hormonas esteroides.

El **sistema de cascada hormonal** se puede aplicar a muchas hormonas, aunque no a todas. Se inicia mediante señales en el sistema nervioso central (SNC), seguidas por secreciones hormonales en el hipotálamo y la hipófisis y, finalmente, interacción con un órgano diana final. En este capítulo se resumen las principales hormonas polipeptídicas y se describe la síntesis de hormonas específicas. Se muestran las líneas generales de la síntesis de las hormonas derivadas de aminoácidos adrenalina y triyodo-L-tironina. Se presentan ejemplos de inactivación y degrada-

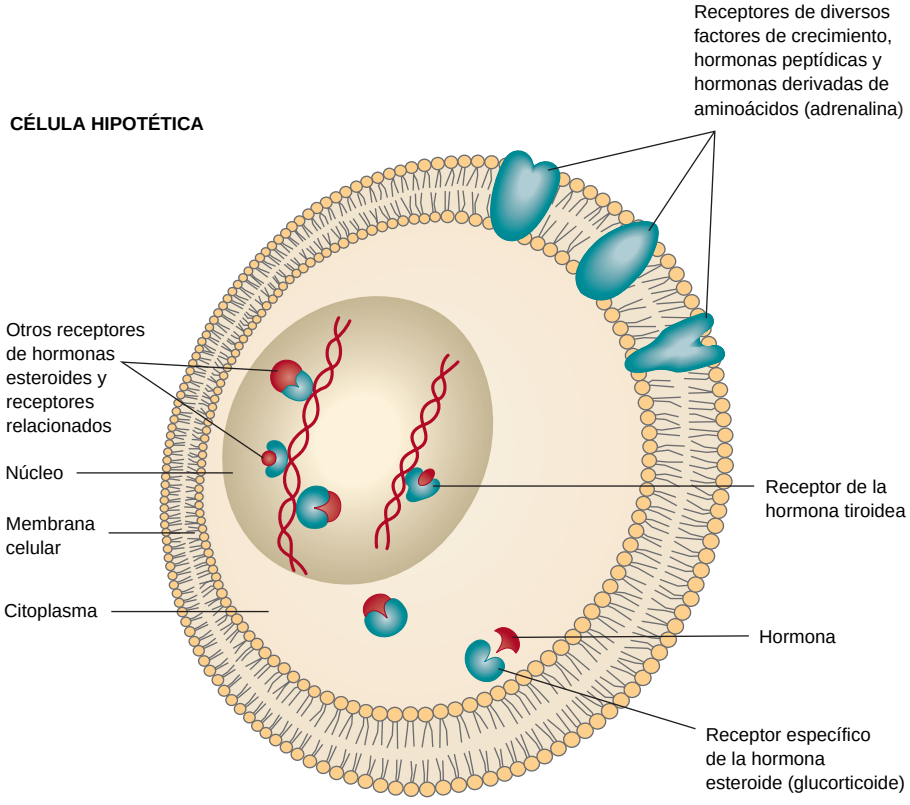


FIGURA 21.1
Dibujo que muestra las distintas localizaciones de los tipos de receptores expresados por una célula diana.

ción de hormonas. El resto del capítulo se centra en los receptores, en la **transducción de señal** y en las **rutas de segundos mensajeros**. Se describe la internalización de receptores y se presentan ejemplos de sistemas cíclicos de cascada hormonal. Por último, se trata la función de los oncogenes y receptores.

En términos de mecanismo del receptor, los aspectos de la interacción hormona–receptor se presentan con un breve análisis matemático. La transducción de señal se estudia especialmente en relación con las proteínas fijadoras de GTP. Los sistemas de segundo mensajero incluyen la ruta del cAMP y de la proteína quinasa A, la ruta del inositol trisfosfato–diacilglicerol y la Ca^{2+}–proteína quinasa C, y la ruta del cGMP y la proteína quinasa G. Estas rutas se tratan en el contexto de la acción de hormonas representativas. Componentes de reciente identificación, pertenecientes a estas rutas de transducción de señal, se definen de acuerdo con el sistema o los sistemas de quinasas implicados. Además, se examinan el receptor de la insulina y su tirosina quinasa y las rutas de segundos mensajeros.

21.2 HORMONAS Y SISTEMA DE CASCADA HORMONAL

En las últimas décadas, la definición de hormona ha sufrido una expansión. Originalmente se consideraba que las hormonas secretadas por glándulas endocrinas representaban todas las hormonas fisiológicamente importantes. Hoy en día, el término **hormona** se refiere a cualquier sustancia de un organismo que porte una señal capaz de producir algún cambio a nivel celular. Así, las **hormonas endocrinas** constituyen una clase de hormonas que se originan en un tejido, o "glándula", y que realizan un trayecto considerable a través de la circulación hasta llegar a la célula diana que expresa receptores específicos. Las **hormonas paracrinas** son producidas en una célula y recorren una distancia relativamente corta para interaccionar con sus receptores específicos en otra célula vecina. Las **hormonas autocrinas** son producidas por la misma célula que constituye la diana de esa hormona (también pueden ser dianas las células circundantes). Por lo tanto, podemos clasificar las hormonas en relación con su radio de acción. A menudo, las hormonas endocrinas que recorren largas distancias hasta sus células diana pueden ser más estables que las hormonas autocrinas que ejercen sus efectos a distancias muy cortas.

El sistema en cascada amplifica una señal específica

En muchos sistemas hormonales de animales superiores, la ruta de la señal se origina en el cerebro y termina en la célula diana final. La Figura 21.2 resume la se-

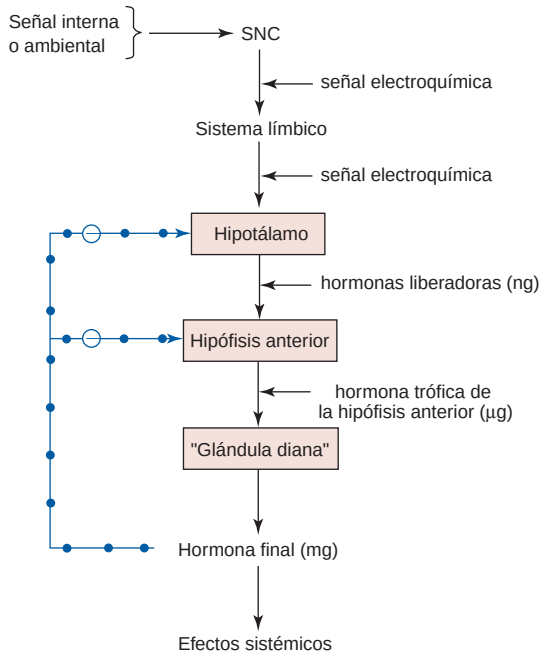


FIGURA 21.2
Cascada hormonal de señales desde el SNC hasta la hormona final.
La "glándula" diana indica el último tejido productor de hormona en la cascada que es estimulado por una hormona adecuada de la hipófisis anterior. La glándula tiroidea, la corteza suprarrenal, el ovario y los testículos serían ejemplo de ello. La hormona final ejerce una retroalimentación negativa en aquellos sitios de la cascada en los que se producen hormonas intermediarias. Las cantidades [nanogramo (ng), microgramo (μg) y miligramo (mg)] indican la cantidad aproximada de hormona liberada.
Reproducido de Norman, A. W. y Litwack, G. Hormones. *New York: Academic Press, 1987, p. 38.*

cuencia de fenómenos que se dan en esta cascada. Se puede originar un estímulo en el medio exterior o en el interior del organismo en esta cascada. Esta señal puede transmitirse como impulso eléctrico (potencial de acción), como señal química o ambos. En muchos casos, aunque no en todos, estas señales se envían al sistema límbico y a continuación al hipotálamo, a la hipófisis y a la glándula diana que secreta la hormona final. Esta hormona afecta entonces a diversas células diana en un grado con frecuencia proporcional al número de receptores celulares específicos que expresan dichas células. Este proceso puede ser una verdadera **cascada** en el sentido de que en los sucesivos niveles (hipotálamo, hipófisis y glándula diana) se producen cantidades mayores de hormonas, y también porque la vida media de estas hormonas en la sangre tiende a ser mayor en la progresión desde la hormona hipotalámica hasta la hormona final. Por ejemplo, en el caso de estrés ambiental existe un único agente estresante (cambio de temperatura, ruido, lesión, etc.). Este agente estresante constituye una señal para la estructura del hipocampo en el sistema límbico, el cual indica al hipotálamo que libere una hormona liberadora hipotalámica, la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que normalmente es secretada en cantidades del orden de nanogramos y puede tener un $t_{1/2}$ en el torrente sanguíneo de algunos minutos. La CRH viaja a través de un sistema portal cerrado hasta alcanzar la **hipófisis anterior**, donde se une a su receptor específico situado en la membrana celular de las células corticotrópicas, y allí pone en marcha un conjunto de cambios metabólicos que dan como resultado la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y de β-lipotropina. La ACTH, la cual es secretada en cantidades de microgramos y tiene un $t_{1/2}$ mayor que el de la CRH, circula en el torrente sanguíneo hasta unirse a sus receptores específicos expresados en las membranas de las células localizadas en la capa interna de la corteza de la glándula adrenal (glándula diana). Aquí induce cambios metabólicos que dan lugar a la síntesis y liberación en 24 h de la hormona final, el cortisol, en cantidades de muchos miligramos y esta hormona glucocorticoide activa tiene un importante $t_{1/2}$ en la sangre. El cortisol es captado por una amplia variedad de células que expresan cantidades variables del receptor intracelular de glucocorticoides. La hormona final, en este caso el cortisol, ejerce una retroalimentación negativa sobre las células de la hipófisis anterior, el hipotálamo y tal vez sobre niveles superiores, dando lugar a una inactivación de la ruta mediante un proceso en el que interviene también el receptor de glucocorticoides. En la **célula diana** los complejos cortisol–receptor median respuestas transcripcionales específicas y los efectos individuales de la hormona se suman para producir los efectos sistémicos del cortisol. En este ejemplo, la cascada está representada por un solo estímulo ambiental que da lugar a una serie sucesiva de hormonas en cantidades progresivamente mayores y con mayor estabilidad, y por la hormona final, que afecta a la mayoría de las células del cuerpo. Muchos otros sistemas funcionan de forma similar, y existen diferentes hormonas liberadoras específicas, hormonas trópicas de la hipófisis anterior y hormonas finales que intervienen en el proceso. Evidentemente, el número de células diana afectadas puede ser mayor o menor en función de la distribución de receptores de cada hormona final.

En un sistema relacionado intervienen las **hormonas de la hipófisis posterior**, oxitocina y vasopresina (hormona antidiurética), que se almacenan en la hipófisis posterior pero que se sintetizan en el cuerpo de células neuronales localizadas en el hipotálamo. Este sistema se muestra en la Figura 21.3; los elementos de la Figura 21.2 se observan en la ruta vertical central. El sistema de la hipófisis posterior se ramifica hacia la derecha desde el hipotálamo. La oxitocina y la vasopresina se sintetizan en distintos cuerpos celulares de neuronas hipotalámicas. Otros cuerpos celulares dedicados a la síntesis de vasopresina se localizan en el núcleo supraóptico y otros cuerpos celulares dedicados a la síntesis de oxitocina se localizan en el núcleo paraventricular. Su liberación desde la hipófisis posterior junto con **neurofisina**, una proteína estabilizadora, tiene lugar separadamente mediante estímulos específicos que actúan sobre cada uno de estos tipos de células neuronales.

Existen señales altamente específicas que dictan la liberación de hormonas polipeptídicas a lo largo de la cascada de este sistema. Así, existen diversas **neuronas aminérgicas** (secretoras de sustancias que contienen aminas como la dopamina y la serotonina) que están conectadas a neuronas que intervienen en la síntesis y liberación de **hormonas liberadoras** del hipotálamo. En la Tabla 21.1 se resumen las hormonas liberadoras. Estas neuronas aminérgicas actúan en función de varios tipos de señales internas y externas, y su actividad responde a **patrones de liberación pulsáti-**

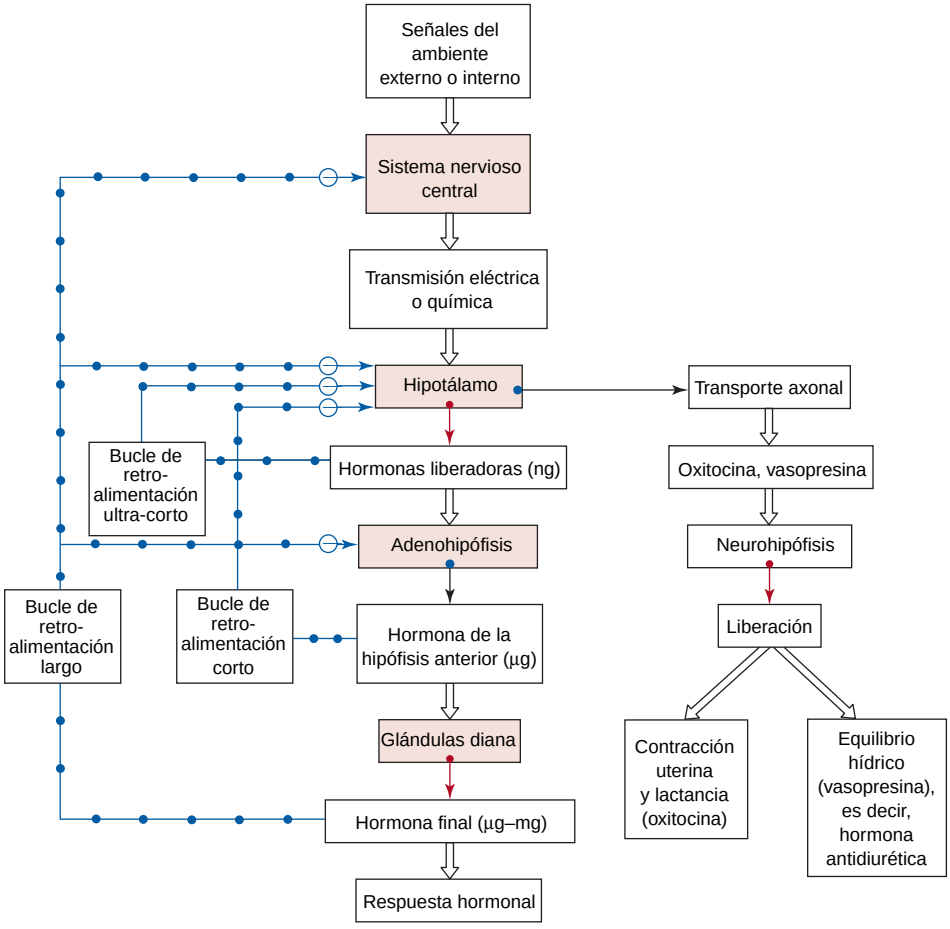


FIGURA 21.3
El hipotálamo interviene en muchos sistemas hormonales.
Cascada de señales hormonales que empieza con una señal ambiental externa o interna. Ésta se transmite en primer lugar al SNC, y también pueden intervenir componentes del sistema límbico, tales como el hipocampo y la amígdala. Estas estructuras inervan el hipotálamo en una región específica, el cual responde con la secreción de una hormona liberadora específica, normalmente en cantidades del orden de nanogramos. Las hormonas liberadoras se transportan a través de un sistema portal cerrado que conecta el hipotálamo con la hipófisis anterior, se unen a receptores de membrana de las células, y dan lugar a la secreción de hormonas de la hipófisis anterior específicas, normalmente en cantidades del orden de microgramos. Éstas acceden a la circulación general a través de capilares con ventanales locales y se unen a receptores de la glándula diana específicos. Las interacciones desencadenan la liberación de una hormona final en cantidades diarias que van de microgramos a miligramos, y que dan lugar a la respuesta hormonal uniéndose a receptores en diversos tejidos diana. En efecto, este sistema global es una cascada amplificadora. Las hormonas liberadoras se secretan en cantidades de nanogramos y tienen una vida media corta del orden de unos pocos minutos. Las hormonas de la hipófisis anterior se producen a menudo en cantidades de microgramos y tienen vidas medias más largas que las hormonas liberadoras. Las hormonas finales pueden producirse a diario en cantidades de miligramos y pueden tener vidas medias mucho más largas. Así, los productos de masa × vida media constituyen un mecanismo de amplificación en cascada. En relación con las diferencias en masa de las hormonas producidas desde el hipotálamo hasta la glándula diana, el orden es de nanogramos a miligramos, es decir, de un millón de veces. Cuando la hormona final tiene receptores prácticamente en cada tipo celular, es posible incidir sobre la química corporal de prácticamente cada célula mediante una única señal ambiental. Por consiguiente, el organismo establece una asociación íntima con el medio ambiente, hecho que tendemos a subestimar. Las flechas con puntos negros en el origen indican un proceso secretor. Las flechas largas sembradas de círculos abiertos o cerrados indican rutas de retroalimentación negativa (bucles de retroalimentación ultracortos, cortos y largos).
Reproducido de Norman, A. W. y Litwack, G. Hormones. *New York: Academic Press, 1987, p. 102.*

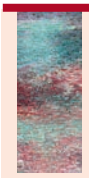
les de determinadas hormonas, tales como la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), y a la **liberación rítmica cíclica** de otras hormonas, tales como el cortisol.

Otra característica destacada de la cascada hormonal (Figura 21.3) es el sistema de **retroalimentación negativa** que actúa cuando se ha secretado a la circulación una cantidad suficiente de hormona final. Generalmente, existen tres bucles de retroalimentación—los **bucles de retroalimentación largo**, **corto** y **ultra-corto**. En el bucle de retroalimentación largo, la hormona final se une a un receptor específico situado dentro o sobre las células de la hipófisis anterior, el hipotálamo y el SNC, para impedir la elaboración adicional de hormonas en las células que intervienen en la

TABLA 21.1 Hormonas liberadoras hipotalámicas[a]

Hormona liberadora	*Número de aminoácidos en la estructura*	*Hormona de la hipófisis anterior liberada o inhibida*
Hormona liberadora-de tirotropina (TRH)	3	Tirotropina (TSH); también puede liberar prolactina (PRL) experimentalmente
Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	10	Hormonas luteinizante (LH) y estimuladora del folículo (FSH) del mismo tipo celular; leucotrieno C_4 (LTC_4) también puede liberar LH y FSH mediante un mecanismo diferente
Factor inhibidor de la liberación de gonadotropina (GnRIF)	12,2 kDa de masa molecular	Inhibida la liberación de LH y FSH
Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	41	ACTH, β-lipotropina (β-LPH), y alguna β-endorfina
Arginina vasopresina (AVP)	9	Estimula la acción de la CRH en la liberación de ACTH
Angiotensina II (AII)	8	Estimula la acción de la CRH en la liberación de ACTH; libera ACTH débilmente
Somatocrinina (GRH)	44	Liberación de hormona del crecimiento (GH)
Somatostatina (GIH)	14	Inhibida la liberación de GH
Péptido liberador de gastrina hipotalámica		Inhibida la liberación de GH y PRL
Factor liberador de prolactina (PRF)		Liberación de prolactina (PRL)
Factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF)		Prueba de que un nuevo péptido puede inhibir la liberación de PRL; la dopamina inhibe también la liberación de PRL, y durante algún tiempo se pensó que se trataba de PIF; la dopamina puede ser un PIF secundario; la oxitocina puede inhibir la liberación de PRL

[a]La hormona estimuladora del melanocito (MSH) es uno de los productos principales de la pars intermedia (Figura 21.5) en la rata y está bajo el control de neuronas aminérgicas. En el ser humano también se puede secretar α-MSH en células del tipo de la pars intermedia, si bien esta estructura es anatómicamente confusa en humanos.



APLICACIÓN CLÍNICA 21.1
Ensayos de la actividad de la hipófisis anterior

Las hormonas liberadoras y análogos químicos, especialmente de los péptidos más pequeños, son sintetizadas actualmente de forma rutinaria. La hormona liberadora de gonadotropina, un decapéptido, está disponible para ser utilizada en la determinación de la función de la hipófisis anterior. Ello es importante cuando una situación patológica puede involucrar bien al hipotálamo, a la hipófisis anterior o al órgano diana. La infertilidad es un ejemplo de tal situación. Lo que hay que determinar es qué órgano falla en la cascada hormonal. Inicialmente, ha de tenerse en cuenta el órgano diana, en este caso las gónadas. Esto puede llevarse a cabo inyectando las hormonas LH o FSH de la hipófisis anterior. Si se produce secreción de hormona sexual, probablemente la glándula final funciona de manera correcta. A continuación, será necesario analizar la hipófisis anterior. Esto puede llevarse a cabo administrando GnRH sintética por inyección intravenosa; a través de esta vía, la GnRH puede alcanzar las células gonadotropas de la hipófisis anterior y generar la secreción de LH y FSH. Habitualmente, los niveles de LH en la sangre se miden en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Estos niveles se determinan mediante radioinmunoensayo (RIA), en el que la LH o hCG radiactivas son desplazadas de la unión a una proteína de unión a LH por la LH presente en la muestra de suero. La magnitud de la competición es proporcional a la cantidad de LH presente en el suero. De este modo, se determina un progreso de la respuesta que estará dentro de los límites normales o será claramente deficiente. Si la respuesta es deficiente, entonces es que las células de la hipófisis anterior no funcionan correctamente y son la causa del síndrome. Por otro lado, la respuesta normal de la hipófisis a la GnRH indicará que el hipotálamo no es funcional. Este hallazgo llevará a examinar el hipotálamo en busca de las condiciones que dan lugar a la insuficiente disponibilidad/producción de hormonas liberadoras. Obviamente, el conocimiento de la estructura de las hormonas y la capacidad de sintetizar hormonas específicas permiten el diagnóstico de estos estados patológicos.

Marshall, J. C. y Barkan, A. L. Disorders of the hypothalamus and anterior pituitary. En: W. Kelley (Ed.), *Internal Medicine*. New York: Lippincott, 1989, p. 2159; y Conn, P. M. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action. *Endocr. Rev.* 7:3, 1986.

cascada. El bucle de retroalimentación corto se pone de manifiesto con la hormona hipofisaria que retroalimenta negativamente al hipotálamo y actúa a través de un receptor específico. En los bucles de retroalimentación ultracortos, el factor de liberación hipotalámico ejerce una retroalimentación a nivel del hipotálamo para inhibir la secreción adicional del mismo factor de liberación. Estos mecanismos proporcionan controles estrictos sobre la operación de la cascada, que responde a señales estimuladoras y a retroalimentación negativa y hacen que este sistema tenga una buena respuesta de reacción frente a las condiciones hormonales. En la Apli. Clín. 21.1 se describen algunos métodos para ensayar las respuestas de la hipófisis anterior.

Hormonas polipeptídicas de la hipófisis anterior

En la Figura 21.4 se muestran las hormonas polipeptídicas de la hipófisis anterior junto con las hormonas que las controlan desde el hipotálamo. Las hormonas principales de la hipófisis anterior son la hormona del crecimiento (GH), la tirotropina u hormona estimuladora de la tiroides (TSH), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la β-lipotropina (β-LTH), la β-endorfina (de células similares a la pars in-

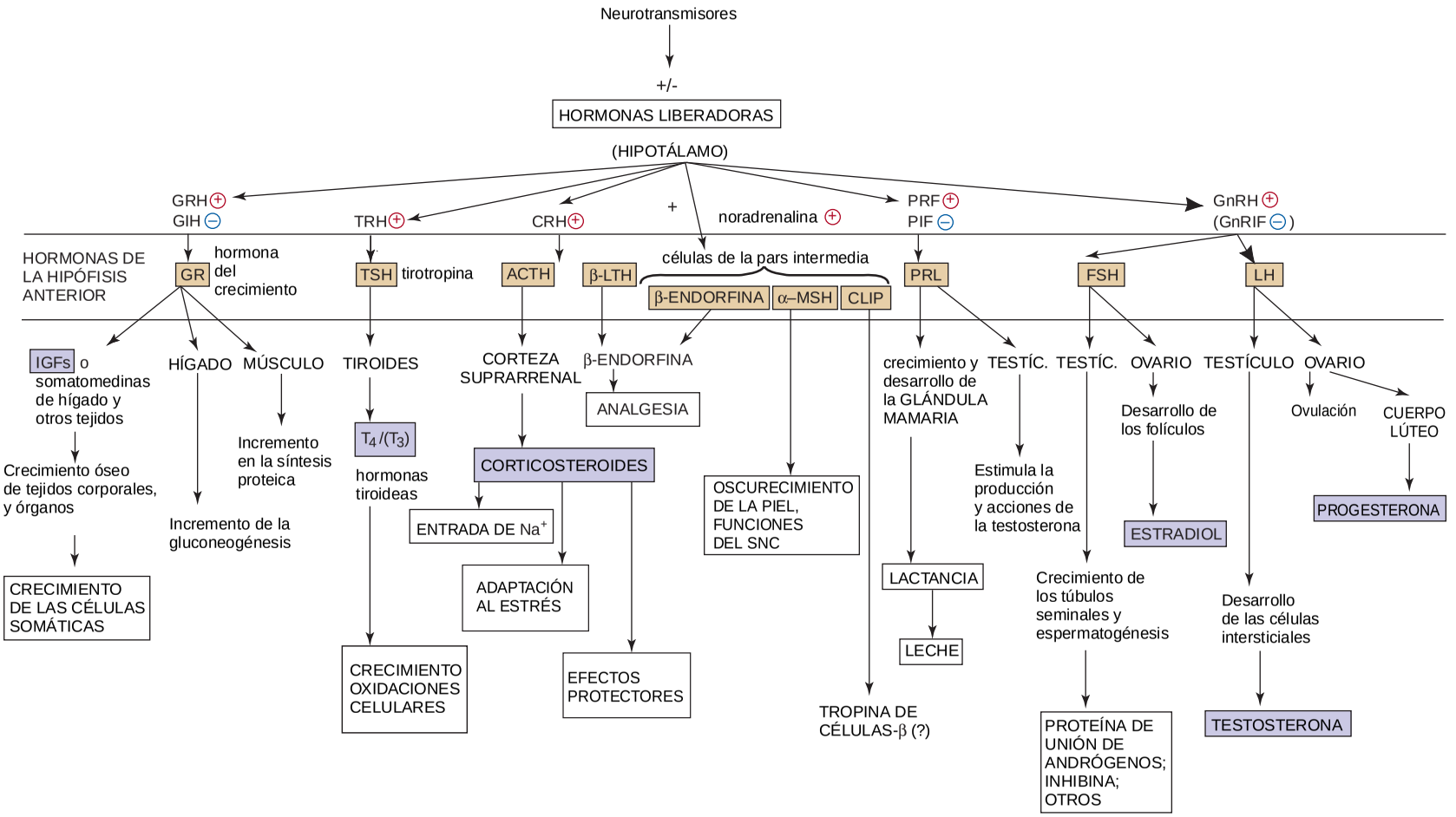
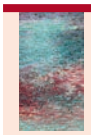


FIGURA 21.4
Visión global de las hormonas de la hipófisis anterior y de su acción junto con hormonas liberadoras hipotalámicas.



APLICACIÓN CLÍNICA 21.2

Hipopituitarismo

El hipotálamo está conectado a la hipófisis anterior mediante un delicado tallo que contiene el sistema portal a través del cual las hormonas liberadoras, secretadas desde el hipotálamo, alcanzan las células de la hipófisis anterior. En las membranas celulares de estas células se encuentran receptores específicos para las hormonas liberadoras. En la mayoría de los casos, células diferentes expresan receptores de hormonas liberadoras diferentes. La conexión entre el hipotálamo y la hipófisis anterior puede romperse por traumatismos o tumores. Los traumatismos puede producirse en accidentes automovilísticos u otros acontecimientos dañinos locales que pueden ocasionar el corte del tallo e impedir que las hormonas liberadoras alcancen sus células diana en la hipófisis anterior. Cuando esto ocurre, las células de la hipófisis anterior dejan de disponer de su mecanismo de señalización para la liberación de las hormonas de la hipófisis anterior. En el caso de tumores de la hipófisis, no todas las hormonas de la hipófisis anterior pueden quedar afectadas de igual forma, y la secreción de alguna de ellas puede interrumpirse más pronto que la de otras. En cualquier caso, si se produce hipopituitarismo esta condición puede resultar en una situación de amenaza para la vida, en la que el clínico ha de determinar la magnitud de la pérdida de hormonas hipofisarias, especialmente ACTH. Las hormonas de la hipófisis posterior —oxitocina y vasopresina— también pueden perderse, causando problemas de micción excesiva (deficiencia de vasopresina) que deben ser tratados. La terapia habitual se basa en la administración de hormonas del órgano diana final, tales como hormona tiroidea, cortisol, hormonas sexuales y progestina; en pacientes femeninos también es preciso mantener el ciclo del ovario. Estas hormonas pueden administrarse fácilmente por vía oral. La falta de hormona del crecimiento no es un problema para el adulto, pero puede constituir un serio problema para el niño en crecimiento. El paciente debe aprender a prever un aumento de las necesidades de cortisol durante situaciones de estrés. Afortunadamente, estos pacientes se mantienen normalmente en condiciones razonablemente buenas.

Marshall, J. C. y Barkan, A. L. Disorders of the hypothalamus and anterior pituitary. En: W. N. Kelley (Ed.), *Internal Medicine.* New York: Lippincott, 1989, p. 2159; y Robinson, A. G. Disorders of the posterior pituitary. En: W. N. Kelley (Ed.), *Internal Medicine.* New York: Lippincott, 1989, p. 2172.

termedia), la α-MSH (de células similares a la pars intermedia), la β-MSH (de células similares a la pars intermedia), el péptido intermediario similar a corticotropina (CLIP; de células similares a la pars intermedia), la prolactina (PRL), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Todas ellas son cadenas polipeptídicas únicas, excepto TSH, FSH y LH que son dímeros que comparten una subunidad α idéntica o similar. Dado que en el ser humano el lóbulo intermedio es rudimentario, los niveles circulantes de α- y β-MSH son relativamente bajos. Es interesante, particularmente en el ser humano, el hecho de que los receptores de MSH reconozcan y sean activados por la ACTH, dado que los 13 primeros aminoácidos de la ACTH contienen la secuencia de la α-MSH. Por ello, puede ser de importancia la contribución de la ACTH a la pigmentación de la piel, y es posible que supere en importancia a la MSH, especialmente en condiciones en que el nivel de la ACTH en la circulación sea elevado. Las consecuencias clínicas del hipopituitarismo se presentan en la Apli. Clín. 21.2.

21.3 | HORMONAS POLIPEPTÍDICAS PRINCIPALES Y SU ACCIÓN

Dado que la comunicación celular es tan específica, no es sorprendente que en el cuerpo exista un gran número de hormonas y que todavía se estén descubriendo otras nuevas. Por limitaciones de espacio sólo se presenta aquí un resumen de algunas de las hormonas mejor caracterizadas. La Tabla 21.2 muestra alguna de las principales hormonas polipeptídicas y su acción. Inspeccionando la Tabla 21.2 resulta evidente que muchas hormonas provocan la liberación de otras sustancias, algunas de las cuales pueden a su vez ser hormonas. En especial, éste es el caso de los sistemas hormonales incluidos en cascadas, tales como los que se presentan en las Figuras 21.2 y 21.3. Otras actividades de los complejos hormona–receptor localizados en las membranas celulares son aumentar el flujo de iones, especialmente de calcio, hacia el interior de la célula, y activar o suprimir la actividad de enzimas en contacto con el receptor o de una proteína transductora con la que interacciona el receptor. Más adelante se exponen algunos ejemplos de este tipo de actividades. En el funcionamiento de la mayoría de complejos receptores de membrana, la estimulación de enzimas o el flujo de iones es seguida por una cadena de fenómenos que pueden describirse como cascadas intracelulares en las que se obtiene un grado elevado de amplificación.

TABLA 21.2 Hormonas polipeptídicas importantes y su acción en el organismo[a]

Origen	*Hormona*	*Acción*
Hipotálamo	Hormona liberadora de tirotropina (TRH)	Actúa sobre la tirotropa para liberar TSH
	Hormona liberadora gonadotrópica (GnRH)	Actúa sobre la gonadotropa para liberar LH y FSH desde la misma célula
	Hormona liberadora de hormona del crecimiento o somatocrinina (GRH)	Actúa sobre la somatotropa para liberar GH
	Hormona inhibidora de la liberación de hormona del crecimiento o somatostatina (GIH)	Actúa sobre la somatotropa para evitar la liberación de GH
	Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	Actúa sobre la corticotropa para liberar ACTH y β-lipotropina
	Vasopresina es una hormona que colabora con la CRH en la liberación de ACTH; la angiotensina II también estimula la acción de la CRH en la liberación de ACTH	
	Factor liberador de prolactina (PRF) (no bien determinado)	Actúa sobre la lactotropa para liberar PRL
	Factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF) (no bien determinado; puede ser una hormona peptídica bajo el control de la dopamina o puede ser la misma dopamina)	Actúa sobre la lactotropa para inhibir la liberación de PRL
Hipófisis anterior	Tirotropina (TSH)	Actúa sobre las células foliculares del tiroides para llevar a cabo la liberación de T_4(T_3)
	Hormona luteinizante (LH) (la gonadotropina coriónica humana, hCG, es una hormona similar liberada en la placenta)	Actúa sobre las células de Leydig del testículo para incrementar la síntesis y liberación de testosterona; actúa sobre el cuerpo lúteo del ovario para incrementar la producción y liberación de progesterona
	Hormona estimuladora del folículo (FSH)	Actúa sobre las células de Sertoli de los túbulos seminíferos para incrementar las proteínas del semen y otras proteínas; actúa sobre los folículos ováricos para estimular la maduración del óvulo y la producción de estradiol
	Hormona del crecimiento (GH)	Actúa sobre células diversas para producir IGF (o somatomedinas), crecimiento celular y sulfatación del hueso
	Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)	Actúa sobre células de la glándula suprarrenal para incrementar la producción y secreción de cortisol
	β-Endorfina	Actúa sobre células y neuronas para producir efectos analgésicos y de otro tipo
	Prolactina (PRL)	Actúa sobre la glándula mamaria para inducir la diferenciación de las células secretoras (junto con otras hormonas) y estimula la síntesis de componentes de la leche
	Hormona estimuladora del melanocito (MSH)	Actúa sobre las células de la piel para estimular la diseminación de la melanina (oscurecimiento de la piel)
Hormonas de glándulas finales	Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF)	Responden a la GH y producen efectos de crecimiento estimulando la mitosis celular
	Hormona tiroidea (T_4/T_3) (hormona derivada de aminoácidos)	Responde a la TSH y estimula reacciones de oxidación en muchas células
	Péptidos opiáceos	Pueden originarse como productos de degradación de la γ-lipotropina o de la β-endorfina o a partir de productos génicos específicos; pueden responder a la CRH o a la dopamina y producir analgesia y otros efectos
	Inhibina	Responde a la FSH en el ovario y células de Sertoli; regula la secreción de FSH desde la hipófisis anterior. La segunda forma de inhibina (activina) puede estimular la secreción de FSH
	Péptido intermediario similar a la corticotropina (CLIP)	Proviene de la hipófisis intermedia por degradación de ACTH; contiene actividad tropina de células β que estimula la liberación de insulina a partir de las céluas β en presencia de glucosa

(*continúa*)

TABLA 21.2 (*Continuación*)

Origen	*Hormona*	*Acción*
Hormonas peptídicas que responden a señales diferentes de las hormonas de la hipófisis anterior	Arginina vasopresina (AVP; hormona antidiurética, ADH)	Responde a un incremento de la actividad del osmorreceptor que detecta la $[Na^+]$ extracelular; incrementa la reabsorción de agua a partir del túbulo distal del riñón
	Oxitocina	Responde al reflejo de succión y al estradiol; provoca eyección de leche en hembras lactantes; interviene en la contracción uterina durante el parto; factor luteolítico producido por el cuerpo lúteo; disminuye la síntesis de esteroides en el testículo
Las células β del páncreas responden a la glucosa y otros componentes de la sangre liberando insulina	Insulina	Incrementa la utilización de glucosa por los tejidos
Las células α del páncreas responden a niveles bajos de glucosa y a la disminución del calcio sérico	Glucagón	Disminuye la utilización de la glucosa por los tejidos para aumentar los niveles de glucosa en la sangre
Provienen de proteínas por acción de la renina y del enzima convertidor	Angiotensinas II y III (AII y AIII)	La renina responde inicialmente a una disminución del volumen sanguíneo o de la $[Na^+]$ en la mácula densa del riñón. AII/AIII estimulan la capa exterior de las células suprarrenales para sintetizar y liberar aldosterona
Liberado desde las aurículas del corazón en respuesta a hipovolemia; regulado por otras hormonas	Factor atrionatriurético (ANF) o atriopeptina	Actúa sobre las células suprarrenales externas disminuyendo la liberación de aldosterona; tiene además otros efectos
Procede del plasma, intestino u otros tejidos	Bradiquinina	Modula la vasodilatación extensa provocando hipotensión
Hipotálamo y mucosa intestinal	Neurotensina	Efectos sobre el intestino; puede presentar actividad neurotransmisora
Hipotálamo, SNC e intestino	Sustancia P	Transmisor del dolor, aumenta las contracciones del músculo liso del tracto gastrointestinal (GI)
Nervios y células endocrinas del intestino; hormona hipotérmica	Bombesina	Incrementa la secreción ácida gástrica
	Colecistoquinina (CCK)	Estimula la contracción de la vesícula biliar y el flujo de bilis; incrementa la secreción de enzimas pancreáticas
Antro del estómago	Gastrina	Incrementa la secreción de ácido gástrico y pepsina
Duodeno a valores de pH por debajo de 4,5	Secretina	Estimula las células acinares pancreáticas para liberar bicarbonato y agua y así aumentar el pH duodenal
Hipotálamo y tracto GI	Péptido vasointestinal (VIP)	Actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso autónomo periférico; relaja los músculos lisos de la circulación; aumenta la secreción de agua y electrolitos desde el páncreas y el intestino
Riñón	Eritropoyetina	Actúa sobre la médula ósea para la diferenciación final e inicia la síntesis de hemoglobina
Cuerpo lúteo del ovario	Relaxina	Inhibe las contracciones del miometrio; su secreción aumenta durante la gestación
	Lactógeno de placenta humano (hPL)	Actúa como PRL y GH debido a la gran cantidad de hPL que se produce
Glándulas salivales	Factor de crecimiento epidérmico	Estimula la proliferación de células derivadas del ectodermo y mesodermo junto con el suero; inhibe la secreción gástrica
Timo	Timopoyetina (α-timosina)	Estimula los fagocitos; estimula la diferenciación de células precursoras a células T inmunocompetentes

(*continúa*)

TABLA 21.2 (*Continuación*)

Origen	*Hormona*	*Acción*
Células C parafoliculares de la glándula tiroides	Calcitonina (CT)	Disminuye los niveles de calcio del suero
Glándulas paratiroides	Hormona paratiroidea (PTH)	Estimula la resorción ósea; estimula la excreción de fosfato por el riñón; aumenta los niveles de calcio del suero
Células endoteliales de los vasos sanguíneos	Endotelina	Vasoconstricción

Fuente: Parte de esta tabla se ha tomado de Norman, A. W. y Litwack, G. *Hormones*. Orlando, FL: Academic Press, 1987.

[a]Esta tabla proporciona solamente un listado parcial de las hormonas polipeptídicas en humanos. TSH, hormona estimuladora del tiroides o tirotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimuladora del folículo; GH, hormona del crecimiento; ACTH, hormona adrenocorticotrópica; PRL, prolactina; T_4, hormona tiroidea (también T_3); IGF, factor de crecimiento similar a la insulina. Para las hormonas liberadoras y para algunas hormonas de otras categorías, la abreviatura puede contener una "H" al final cuando la hormona está bien caracterizada; una "F" en lugar de H indica "Factor" cuando la hormona no está bien caracterizada. Los nombres de las hormonas pueden contener los sufijos "trópica" o "trófica"; en el presente texto se utiliza principalmente trópica. Trópica indica una hormona que da lugar a un cambio, mientras que trófica indica que la hormona favorece el crecimiento. Ambos términos pueden utilizarse para la misma hormona en fases diferentes del desarrollo. Muchas de estas hormonas poseen efectos adicionales a los aquí listados.

21.4 GENES Y FORMACIÓN DE HORMONAS POLIPEPTÍDICAS

Los genes de las hormonas polipeptídicas contienen la secuencia codificadora de la hormona y los elementos de control en el lado 5′ del gen estructural. En algunos casos, un solo gen codifica más de una hormona. Un ejemplo de ello es la **proopiomelanocortina**, un precursor hormonal proteico que codifica las siguientes hormonas: ACTH, β-lipotropina y otras hormonas tales como la γ-lipotropina, la γ-MSH, la α-MSH, el CLIP, la β-endorfina y, potencialmente, la β-MSH y las encefalinas. La oxitocina y la vasopresina están codificadas en genes distintos junto con la información de las respectivas **neurofisinas**, proteínas que se unen a la hormona completa y la estabilizan.

La proopiomelanocortina es un polipéptido precursor de ocho hormonas

La proopiomelanocortina, tal como se esquematiza en la Figura 21.5, puede dar lugar a un mínimo de ocho hormonas a partir de un solo producto génico. No todos los productos aparecen a la vez en un solo tipo de célula, sino que se producen en células separadas en función de su contenido en proteasas específicas, necesarias para cortar el propéptido, de controles metabólicos específicos y de la presencia de diferentes reguladores positivos. Así, mientras que la proopiomelanocortina se expresa tanto en la célula corticotrópica de la hipófisis anterior como en la célula de la pars intermedia, los estímulos y productos son diferentes, tal como se resume en la Tabla 21.3. La pars intermedia es una estructura anatómica discreta que en la rata se localiza entre la hipófisis anterior y posterior (Figura 21.6). Sin embargo, en el hombre, la pars intermedia no es una estructura anatómica discreta, aunque el tipo celular puede estar presente en una localización equivalente.

Muchas hormonas polipeptídicas están codificadas por un solo gen

Otros genes que codifican más de un péptido son los genes de la vasopresina y la oxitocina y sus neurofisinas acompañantes, productos que se liberan desde la hipófisis posterior por estimulación específica. De forma muy similar al modo en que se forman la ACTH y la β-lipotropina (β-LPH) a partir del péptido precursor de la proopiomelanocortina, los productos vasopresina, neurofisina II y una glucoproteína de función desconocida hasta el momento se separan del precursor de la vasopresina. Para la oxitocina y la neurofisina I se da una situación similar (Figura 21.7).

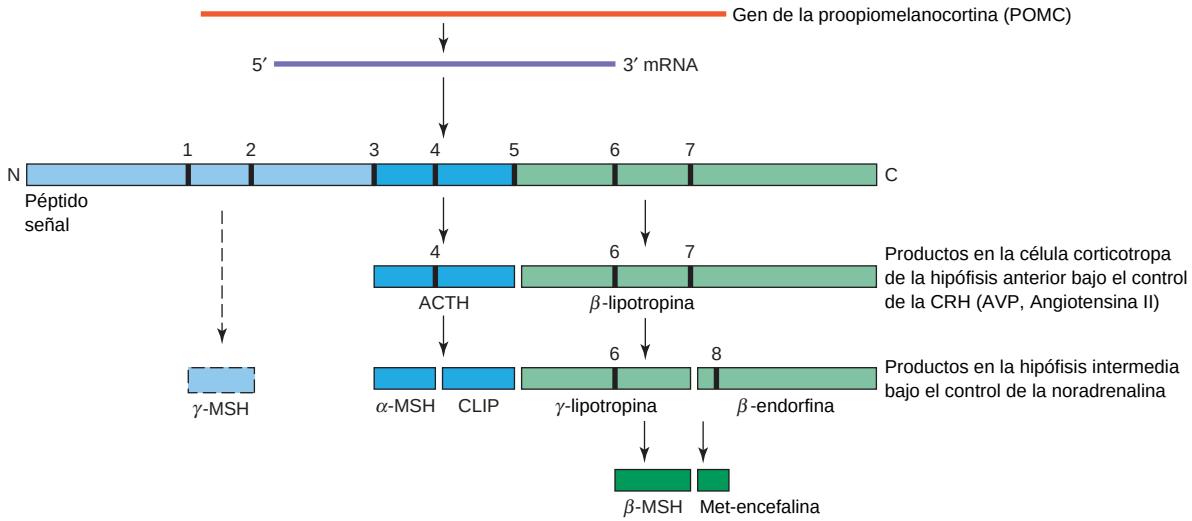


FIGURA 21.5
La proopiomelanocortina es un producto polipeptídico codificado por un solo gen.
Las barras verticales negras indican sitios de corte proteolítico por parte de enzimas específicos. Los sitios de corte son Arg-Lys, Lys-Arg o Lys-Lys. Los aminoácidos vecinos también pueden conferir cierta especificidad. En la célula corticotropa de la hipófisis anterior se encuentran enzimas que cortan por los sitios 3 y 5, liberando los productos principales, ACTH y β-lipotropina, en la circulación general. En la pars intermedia, especialmente en vertebrados que se encuentran por debajo del ser humano, estos productos son posteriormente cortados por los sitios principales 4, 6 y 7, liberando α-MSH, CLIP, γ-lipotropina y β-endorfina en la circulación general. Una parte de la β-lipotropina originada en la corticotropa puede ser a continuación degradada para dar lugar a β-endorfina. Estos dos tipos de células parecen estar bajo distinto control. La célula corticotropa de la hipófisis anterior está bajo el control positivo de la CRH y sus adyuvantes auxiliares, la arginina vasopresina (AVP) y la angiotensina II. La AVP por sí sola no libera ACTH, pero potencia la acción de la CRH en este proceso. La liberación de los productos de la hipófisis intermedia, α-MSH, CLIP (péptido intermediario similar a la corticotropina), γ-lipotropina y β-endorfina está bajo el control positivo de la noradrenalina más que de la CRH. Es obvio que deben existir diferentes proteasas en estos distintos tipos celulares para generar una serie específica de productos hormonales. La β-endorfina contiene asimismo un pentapéptido, la encefalina, que puede ser liberado en algún momento (hidrólisis en la posición 8).

La **vasopresina** y la **neurofisina II** son liberadas mediante la actividad de barorreceptores y osmorreceptores que detectan, respectivamente, una disminución de la presión sanguínea o un aumento de la concentración extracelular de iones sodio. Generalmente, la **oxitocina** y la **neurofisina I** son liberadas de la hipófisis posterior en respuesta a la succión en hembras lactantes o por otros estímulos mediados por un mecanismo colinérgico específico. La liberación de oxitocina–neurofisina I puede desencadenarse mediante inyección de estradiol. La liberación de vasopresina–neurofisina II puede estimularse por administración de nicotina. Los dos agentes liberadores distintos y específicos, estradiol y nicotina, demuestran que la oxitocina y la vasopresina, junto con sus respectivas neurofisinas, se sintetizan y liberan

TABLA 21.3 Resumen de los estímulos y productos de la proopiomelanocortina[a]

Tipo celular	Corticotropa	Pars intermedia
Estímulo	CRH (+) (Cortisol (−))	Dopamina (−) Noradrenalina (+)
Estímulo auxiliar	AVP, AII	
Productos principales	ACTH, β-lipotropina (β-endorfina)	α-MSH, CLIP, γ-lipotropina, β-endorfina

[a]CRH, hormona liberadora de corticotropina; AVP, arginina vasopresina; AII, angiotesina II; ACTH, adrenocorticotropina; α-MSH, hormona estimuladora de melanocitos α; CLIP, péptido intermediario similar a la corticotropina.

Nota: Si bien existen *células de la pars intermedia* en la hipófisis humana, éstas no constituyen un lóbulo diferenciado.

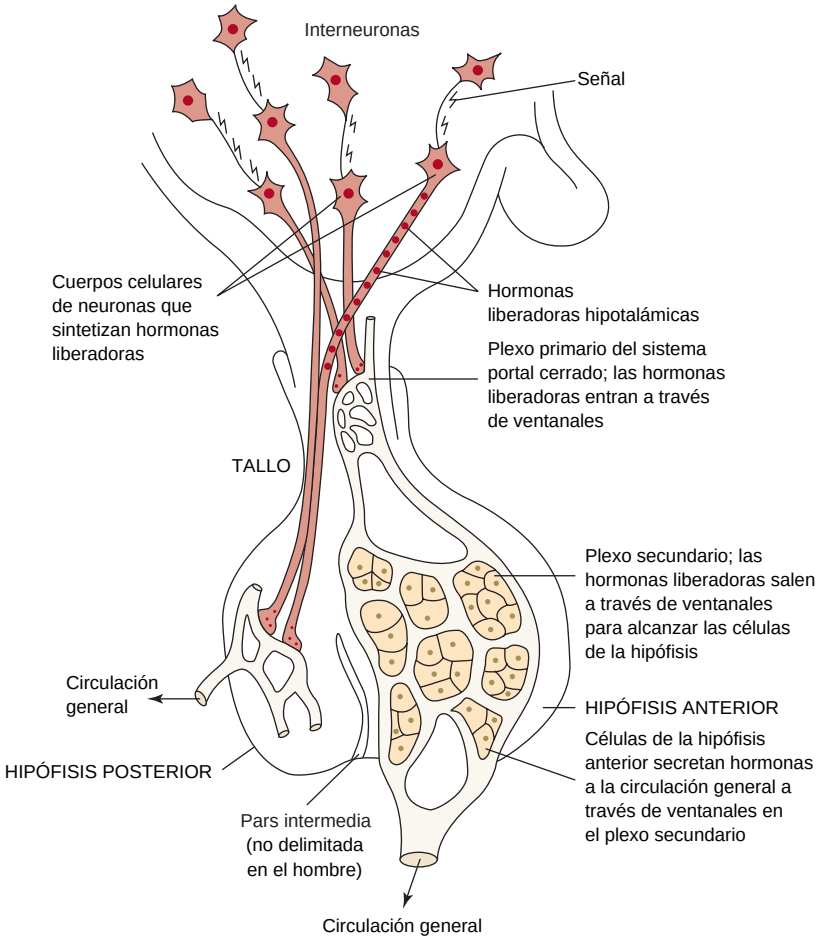


FIGURA 21.6
Núcleos del hipotálamo en los que se sintetizan las distintas hormonas liberadoras hipotalámicas.
Se muestra el sistema vascular principal que consta de un plexo primario, donde las hormonas liberadoras entran en la circulación a través de ventanales, y el plexo secundario en la hipófisis anterior, donde las hormonas liberadoras salen de la circulación de nuevo a través de ventanales hacia las células diana de la hipófisis anterior. También se muestra los efectos de las hormonas liberadoras hipotalámicas, que provocan la secreción de las hormonas de la hipófisis anterior en la circulación general.
Adaptado de Norman, A. W. y Litwack, G. Hormones. *New York: Academic Press, 1987, p. 104.*

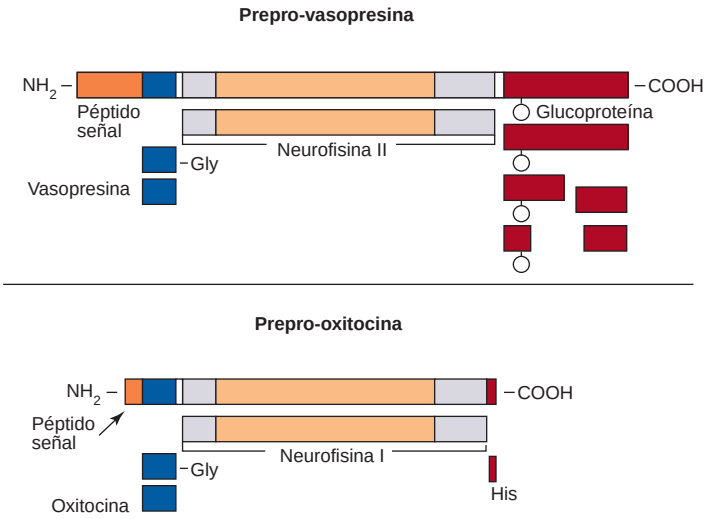


FIGURA 21.7
Prepro-vasopresina y prepro-oxitocina.
La maduración proteolítica avanza de arriba a abajo para cada precursor. La organización de los productos de la traducción del gen es similar en ambos casos, con la excepción de que un glucopéptido se añade en la región C-terminal de la proproteína de la vasopresina. Las barras anaranjadas de la neurofisina indican regiones de aminoácidos conservadas; las barras grises representan extremos N y C-terminales variables.
Adaptado con permiso de Richter, D. Trends Biochem. Sci. *8:278, 1983.*

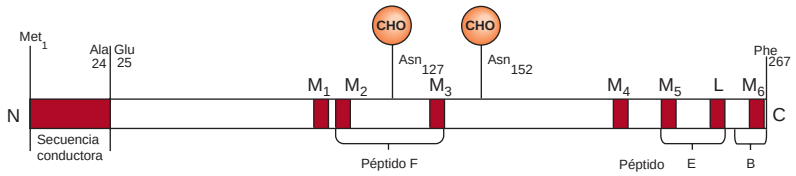


FIGURA 21.8
Modelo del precursor de la encefalina.
Distribución de las secuencias de Met-encefalina (M_1–M_6) y de las secuencias de Leu-encefalina (L) en el precursor proteico de la médula adrenal bovina. CHO, sitios potenciales de unión a glúcido.
Adaptado de Comb, M., Seeburg, P. H., Adelman, J., Eiden, L. y Herbert, E. Nature *295:663, 1982.*

desde diferentes tipos celulares. Aunque la oxitocina es bien conocida por su acción liberadora de leche en la hembra lactante, en el varón parece estar asociada con un aumento de la síntesis de testosterona en el testículo.

Se están descubriendo otras hormonas polipeptídicas codificadas por un solo gen. Un ejemplo de ello es el descubrimiento del gen que codifica la GnRH, un decapéptido que parece residir a la izquierda de un gen que codifica el péptido asociado a la GnRH (GAP), y que, al igual que la dopamina, puede inhibir la liberación de prolactina. Por lo tanto, ambas hormonas —la GnRH y el factor inhibidor de la liberación de prolactina (GAP)— parecen secretarse por las mismas células hipotalámicas.

Un solo gen puede codificar múltiples copias de una hormona

Las encefalinas, secretadas por las células cromafines de la médula adrenal, constituyen un ejemplo de copias múltiples de una sola hormona codificadas por un único gen. Las **encefalinas** son pentapéptidos con actividad opiácea; la metionina-encefalina (Met-ENK) y la leucina-encefalina (Leu-ENK) presentan las estructuras siguientes:

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (Met-ENK)
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (Leu-ENK)

En la Figura 21.8 se presenta un modelo de precursor de encefalina que codifica varias moléculas de Met-ENK (M) y una molécula de Leu-ENK (L). De nuevo, enlaces Lys–Arg, Arg–Arg y Lys–Lys intervienen en los sitios de maduración para la liberación de moléculas de encefalina a partir de la proteína precursora.

Muchos genes de hormonas codifican una sola copia de la hormona y ésta puede ser la situación general. En la Figura 21.9 se muestra un ejemplo de un gen para una única hormona. La información para la hormona CRH está contenida en el segundo exón, mientras que la información del primer exón no se expresa. La disponibilidad de cDNA que contienen la información para la expresión de CRH y

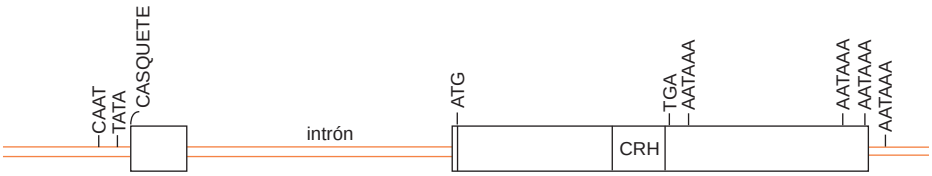


FIGURA 21.9
Secuencia nucleotídica de los genes *proCHR* de rata.
Representación esquemática del gen *proCHH* de rata. Los exones se muestran como bloques y el intrón mediante una doble línea roja. Se indican las secuencias TATA y CAAT, el sitio hipotético del casquete, el codón ATG de inicio de traducción, el codón de final de traducción, TGA, y las señales de poliadenilación (AATAAA). La localización del péptido CRH está indicada por CRH.
Adaptado de Thompson, R. D., Seasholz, A. F y Herbert, E. Mol. Endocrinol. *1:363, 1987.*

su utilización como sondas permiten la localización de la hormona en los tejidos. El uso de este DNA como sonda en extractos de RNA procedentes de diferentes tejidos muestra la localización del mRNA de CRH en los testículos, tallo cerebral y glándula adrenal, además de en la hipófisis y el hipotálamo. La presencia de la hormona en tejidos extrahipotalámicos y extrahipofisiarios y sus funciones son objeto de activa investigación.

21.5 | SÍNTESIS DE HORMONAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS

Un gran número de hormonas y neurotransmisores provienen de aminoácidos, principalmente tirosina y fenilalanina. El glutamato, el aspartato y otros compuestos también son importantes sustancias neurotransmisoras. Aunque pueda existir cierta confusión acerca de qué compuestos son neurotransmisores y cuáles son hormonas, está claro que la adrenalina de la médula adrenal es una hormona, mientras que la noradrenalina es un neurotransmisor. En esta sección se abordan la adrenalina y la tiroxina o triyodotironina. Las aminas biógenas, tales como la dopamina, que se consideran neurotransmisores, se tratan en el Capítulo 23.

La adrenalina se sintetiza a partir de fenilalanina/tirosina

La síntesis de adrenalina tiene lugar en la médula adrenal. En la corteza suprarrenal se producen numerosas hormonas esteroides, incluidas la aldosterona, el cortisol y la deshidroepiandrosterona, que se abordan en el Capítulo 22. Las reacciones bioquímicas que dan lugar a la formación de **adrenalina** a partir de tirosina o fenilalanina se presentan en la Figura 21.10. La adrenalina es una hormona principal secretada por las células cromafines de la médula adrenal junto con algo de noradrenalina, encefalinas y una cierta cantidad del enzima dopamina-β-hidroxilasa. La señal que indica la secreción de adrenalina es la respuesta neuronal al estrés, que se transmite a la médula adrenal a través de una neurona acetilcolinérgica preganglional (Figura 21.11). La liberación de acetilcolina por la neurona aumenta la disponibilidad de iones calcio intracelulares, lo cual estimula la exocitosis y la liberación del material almacenado en los **gránulos cromafines** (Figura 21.11*b*). Este sistema global de síntesis, almacenamiento y liberación de adrenalina desde la médula adrenal está regulado mediante controles neuronales, y también mediante hormonas glucocorticoides sintetizadas y secretadas por la corteza suprarrenal como respuesta al estrés. Ya que los productos de la corteza suprarrenal son transportados a través de la médula adrenal en su camino hacia la circulación general, el cortisol aumenta en la médula e induce la **feniletanolamina *N*-metiltransferasa (PNMT)**, un enzima clave que cataliza la conversión de noradrenalina a adrenalina. Así, en términos bioquímicos, la respuesta al estrés a nivel de la corteza suprarrenal asegura la producción de adrenalina en la médula adrenal (Figura 21.12). Presumiblemente, una vez secretada en el torrente circulatorio, la adrenalina no sólo afecta a los receptores α de los hepatocitos para finalmente aumentar los niveles de glucosa en la sangre, tal como aquí se indica, sino que también interacciona con los receptores α de las células vasculares del músculo liso y de los pericitos para provocar contracción celular y aumento de la presión sanguínea.

La síntesis de hormona tiroidea requiere la incorporación de yodo en una tirosina de la tiroglobulina

En la Figura 21.14 se presenta un esquema de la biosíntesis y secreción de la hormona tiroidea, **tetrayodo-L-tironina (T_4)**, también denominada **tiroxina**, y su correspondiente forma celular activa, **triyodo-L-tironina (T_3)** (las estructuras se muestran en la Figura 21.13). La glándula tiroidea está especializada en concentrar yoduro desde la sangre y, a través de una serie de reacciones mostradas en las Figuras 21.13 y 21.14, se producen monoyodotirosina (MIT), diyodotirosina (DIT), T_4 y T_3, formando parte de la **tiroglobulina** (TG). Así, los aminoácidos yodados y las tironinas se almacenan como parte de la tiroglobulina en el folículo tiroideo. En la secuencia de la tiroglobulina existen "puntos calientes" (regiones de yodación

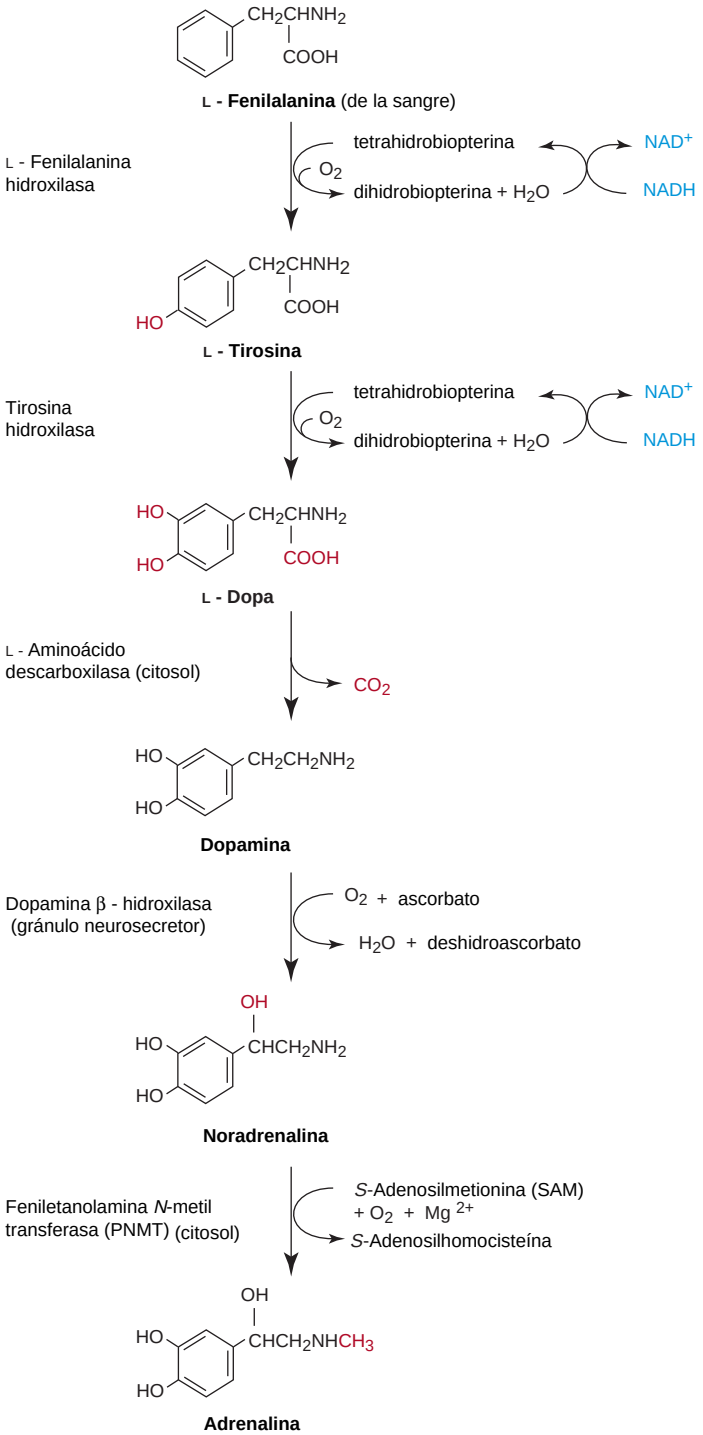


FIGURA 21.10
Síntesis de adrenalina en las células cromafines de la médula adrenal.

muy activa) para la incorporación de yodo. Las secuencias alrededor de yodotirosilos se encuentran en tres grupos consenso: Glu/Asp-Tyr, asociada a la síntesis de tiroxina o yodotirosinas; Ser/Thr-Tyr-Ser, asociada a la síntesis de yodotironina y yodotirosina y Glu-X-Tyr, asociada con los yodotirosilos restantes de la secuencia. La secreción de T_3 y T_4 al torrente sanguíneo requiere la endocitosis de la tiroglobulina almacenada en el folículo y su proteólisis en el interior de la célula epitelial. La DIT y MIT liberadas son desyodadas y los iones yoduro liberados se reciclan y reutilizan para la síntesis de hormona.

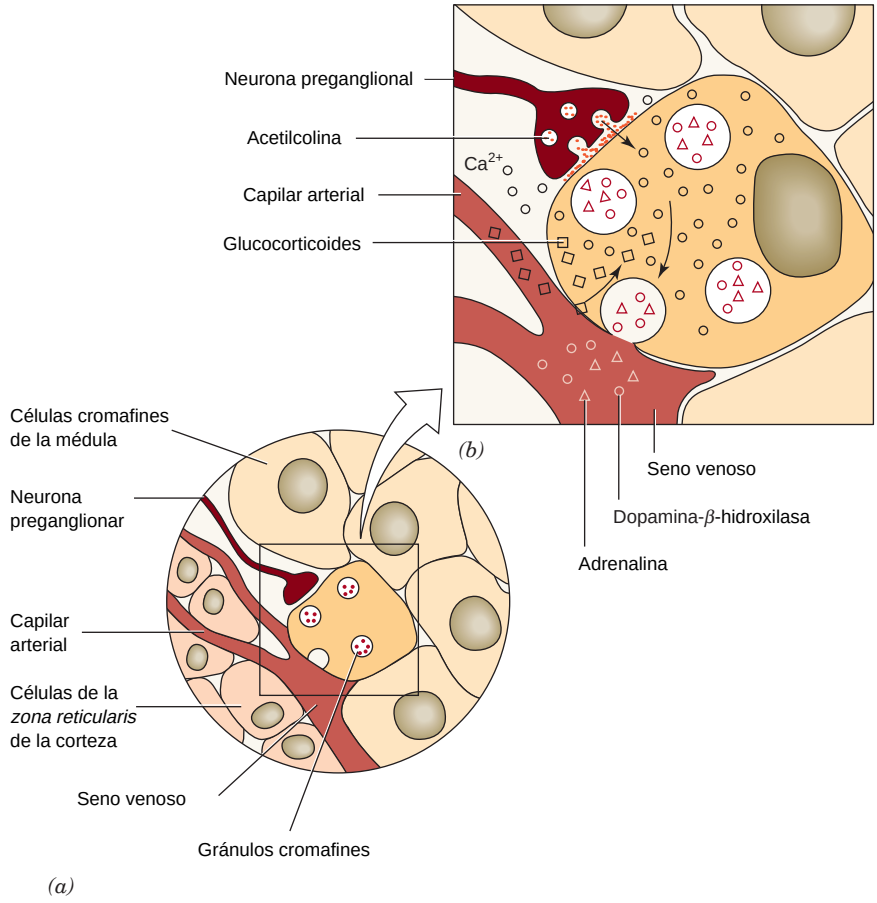


FIGURA 21.11
Relación entre las células cromafines de la médula adrenal, la inervación de la neurona preganglionar, los elementos estructurales que intervienen en la síntesis de adrenalina y la descarga de catecolaminas en respuesta a la acetilcolina.
(*a*) Relación funcional entre médula y corteza en el control de la síntesis de catecolaminas suprarrenales. Los glucocorticoides que estimulan enzimas que catalizan la conversión de noradrenalina a adrenalina llegan a las células cromafines desde los capilares mostrados en (*b*). (*b*) Descarga de catecolaminas desde los gránulos de almacenamiento en las células cromafines tras la estimulación de fibras nerviosas, y que da como resultado la liberación de acetilcolina. Como consecuencia, entra calcio en las células, produciendo la fusión de membranas granulares con la membrana plasmática y la exocitosis del contenido.
Adaptado de Krieger, D. T. y Hughes, J. C. (Eds.). Neuroendocrinology. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1980.

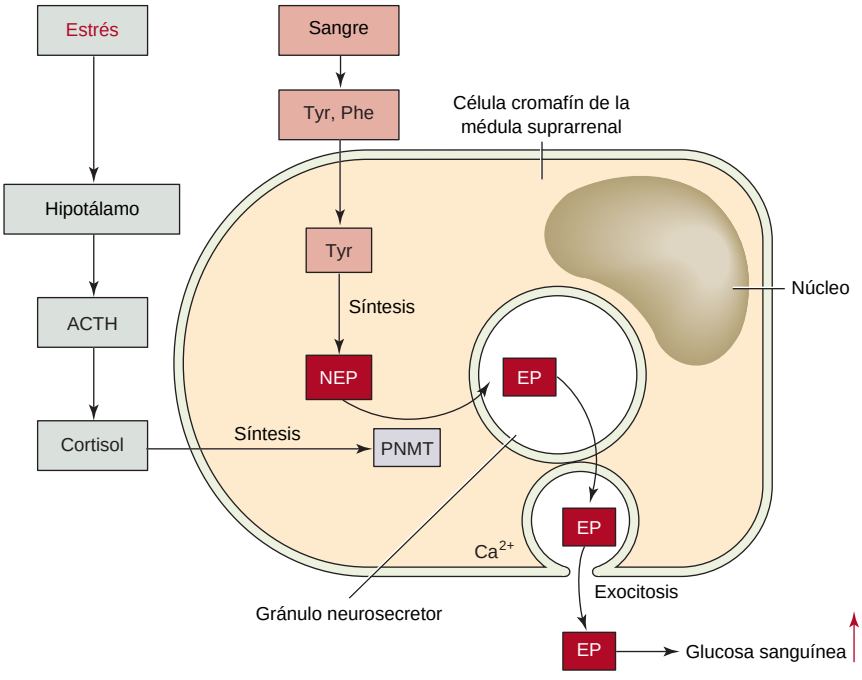


FIGURA 21.12
Biosíntesis, empaquetamiento y liberación de adrenalina en la célula cromafín de la médula adrenal.
PNMT, feniletanolamina *N*-metiltransferasa; EP, adrenalina; NEP, noradrenalina. Los gránulos neurosecretores contienen adrenalina, dopamina β-hidroxilasa, ATP, Met- o Leu-encefalina, así como péptidos de mayor tamaño que contienen encefalina, o noradrenalina en lugar de adrenalina. La adrenalina y la noradrenalina se almacenan en células distintas. Aunque no se sabe con certeza, las encefalinas podrían encontrarse también en células distintas.
Adaptado de Norman, A. W. y Litwack, G. Hormones. *New York: Academic Press, 1987, p. 464.*

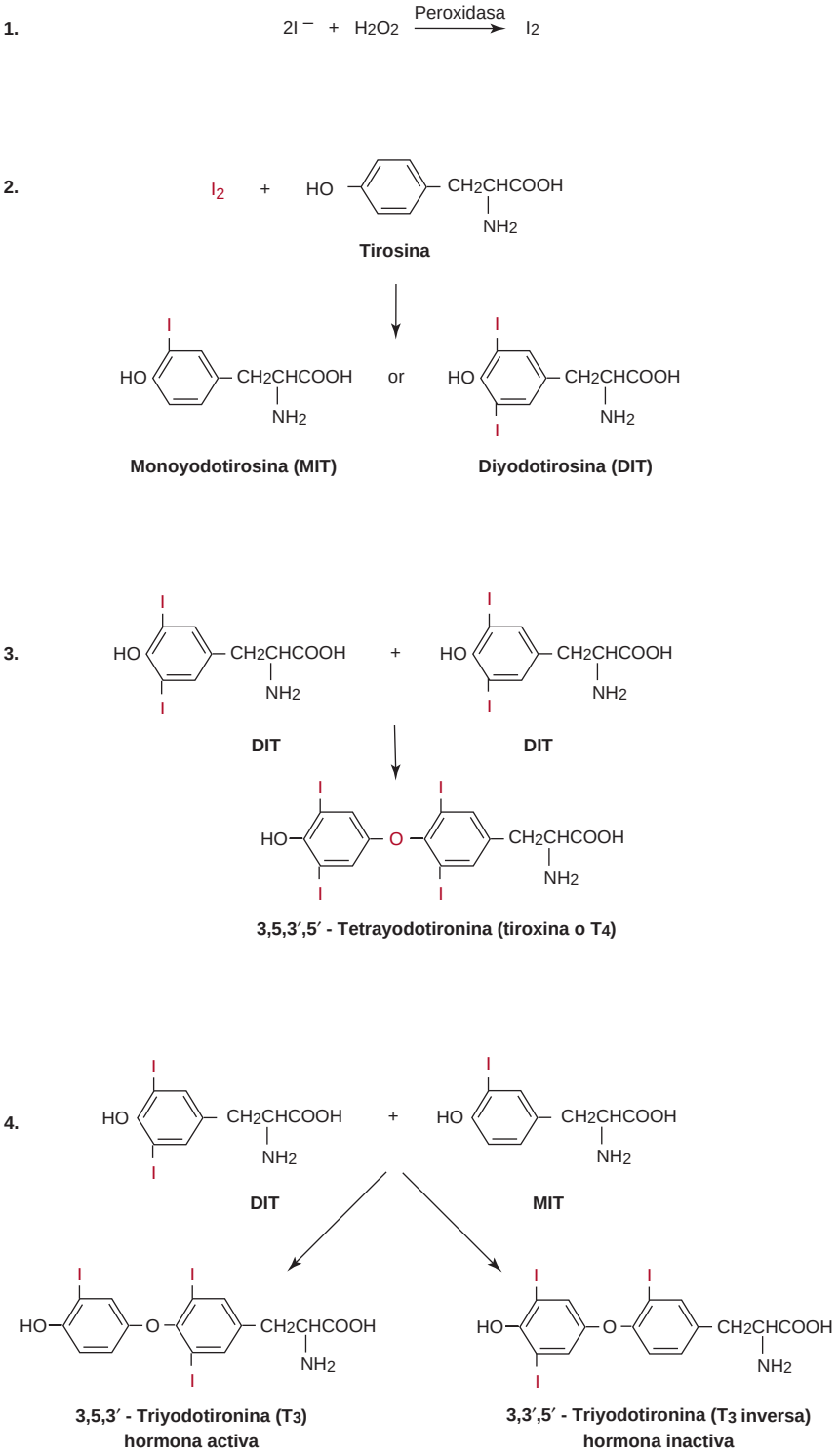


FIGURA 21.13
Síntesis y estructuras de las hormonas tiroideas T_4, T_3, y T_3 inversa.
Etapa 1, oxidación del yoduro; Etapa 2, yodación de los residuos de tirosina; Etapa 3, acoplamiento de DIT a DIT; Etapa 4, acoplamiento de DIT a MIT (el acoplamiento puede ser intramolecular o intermolecular).

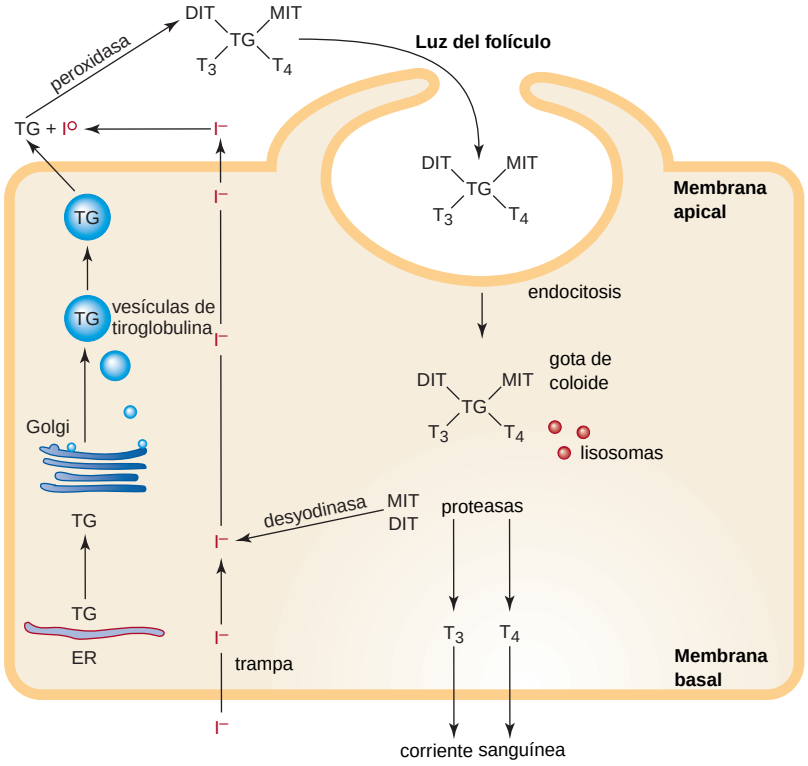


FIGURA 21.14
Mecanismos celulares implicados en la liberación de T_3 y T_4 al torrente sanguíneo.
La captura de yoduro en la membrana basal de las células del epitelio tiroideo concentra el yoduro unas 30 veces. La secreción de T_3 y T_4 al torrente sanguíneo requiere la endocitosis de tiroglobulina y la posterior proteólisis. La DIT y la MIT son desyodadas y los iones yoduro liberados se reutilizan en la síntesis de hormona.
Reproducido de Berne, R. M. y Levy, M. L. (Eds.) Physiology, *2nd ed. St. Louis, MO: C.V. Mosby, 1988, p. 938.*

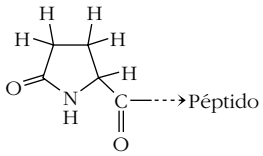
21.6 INACTIVACIÓN Y DEGRADACIÓN DE HORMONAS

La mayoría de las hormonas polipeptídicas se degradan a aminoácidos mediante la acción de proteinasas, presumiblemente en los **lisosomas**. Sin embargo, ciertas hormonas contienen aminoácidos modificados; por ejemplo, entre las hormonas liberadoras hipotalámicas, el aminoácido N-terminal puede ser **ácido cicloglutámico** (o ácido piroglutámico) (Tabla 21.4) y una amida del aminoácido C-terminal. En la Tabla 21.4 se muestra un listado de algunas de las hormonas liberadoras que tie-

TABLA 21.4 Hormonas liberadoras hipotalámicas que contienen un piroglutamato N-terminal,[a] una amida en el aminoácido C-terminal, o ambos

Hormona	*Secuencia*
Hormona liberadora de tirotropina (TRH)	*pGlu*-H-*Pro*-NH_2
Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	*pGlu*-HWSYGLRP-*Gly*-NH_2
Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLAQQAHSNRKLLDI-*Ala*-NH_2
Somatocrinina (GRH)	YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERG-ARAR-*Leu*-NH_2

[a]La estructura del piroglutamato es



[b]Códigos de una sola letra utilizados para los aminoácidos: Ala, A; Arg, R; Asn, N; Asp, D; Cys, C; Glu, E; Gln, Q; Gly, G; His, H; Ile, I; Leu, L; Lys, K; Met, M; Phe, F; Pro, P; Ser, S; Thr, T; Trp, W; Tyr, Y; Val, V.

TABLA 21.5 Ejemplos de hormonas que contienen una estructura de puente disulfuro de cistina

Hormona	*Secuencia*[a]
Somatostatina (GH)	FFNKCGA[1] W S K S TFTSC[14]
Oxitocina	YC[1] I S E S NCPLG—NH_2
Arg vasopresina	YC F S Q S NCPRG—NH_2

[a]Las letras corresponden a las abreviaturas de los aminoácidos en código de una sola letra (Tabla 21.4).

nen uno de estos derivados de aminoácido o ambos. Aparentemente, la rotura del anillo cíclico del glutamato o el corte de la amida C-terminal puede dar lugar a la inactivación de muchas de estas hormonas y se han encontrado tales actividades enzimáticas en la sangre. Esta actividad explica probablemente en parte la corta vida media de muchas de estas hormonas.

Algunas hormonas contienen una estructura en anillo unida por un puente disulfuro de cistina. En la Tabla 21.5 se dan unos cuantos ejemplos de ello. Las hormonas peptídicas pueden degradarse inicialmente por acción aleatoria de la **cistina aminopeptidasa** y la **glutatión transhidrogenasa**, tal como se muestra en la Figura 21.15. Alternativamente, tal como se ha sugerido en el caso de la oxitocina, el péptido puede degradarse mediante proteólisis parcial en péptidos cortos, alguno de los cuales puede tener acción hormonal por sí mismo. La maduración de **prohormonas** implica en muchos casos proteólisis (Figura 21.5).

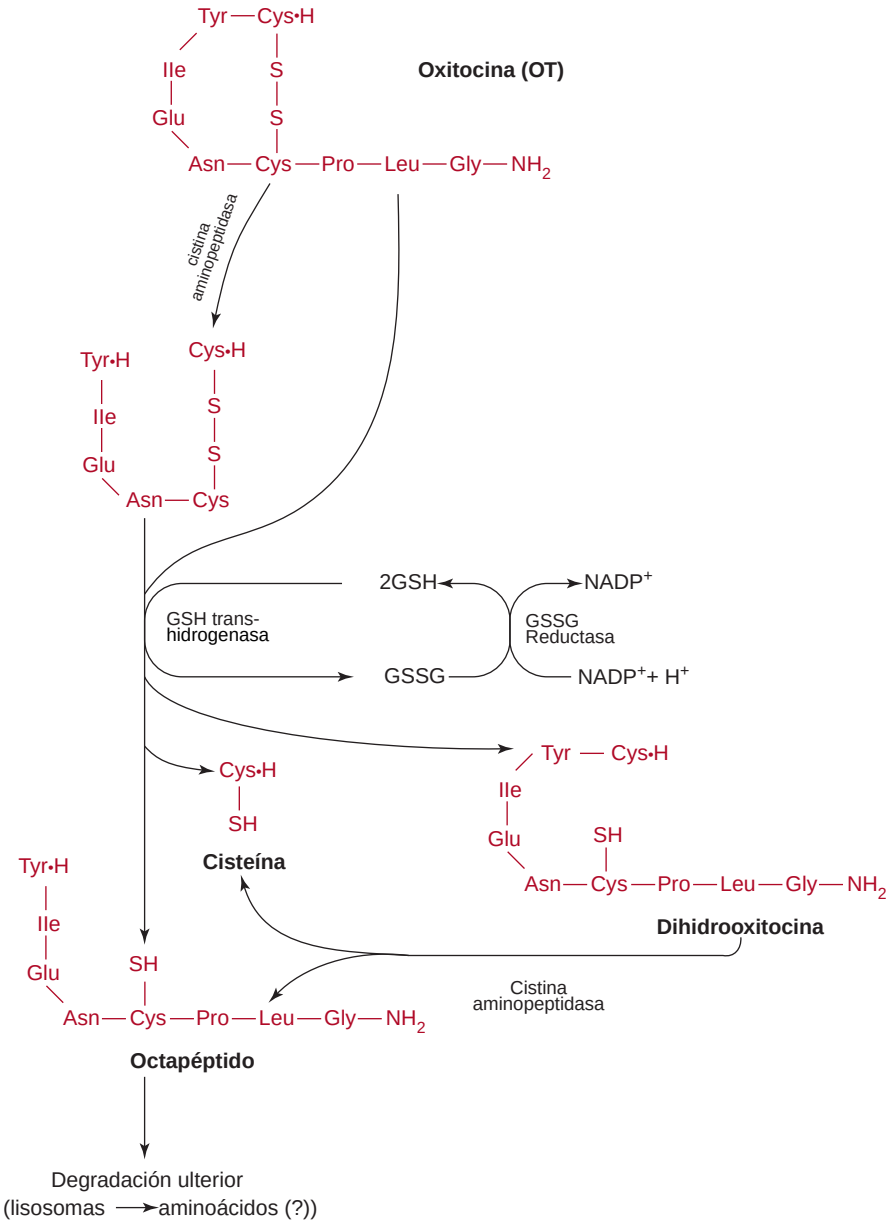


FIGURA 21.15
Degradación de hormonas de la hipófisis posterior.
La oxitocina transhidrogenasa es similar a los enzimas que degradan la insulina; es posible que estos enzimas degraden también la vasopresina.
Reproducido de Norman, A. W. y Litwack, G. Hormones. *New York: Academic Press, 1987, p. 167.*

21.7 REGULACIÓN CELULAR Y SECRECIÓN HORMONAL

La secreción hormonal está sujeta a control específico. En los sistemas en cascada mostrados en las Figuras 21.2 y 21.3, las hormonas deben surgir de una fuente, producir la liberación de hormona a partir del siguiente tipo celular en la línea y así sucesivamente a lo largo del sistema en cascada. Las respuestas correctas deben producirse a partir de un estímulo específico. La precisión de estas señales está definida por la hormona y el receptor, así como por la actividad del SNC que, en muchos casos, precede a la respuesta hormonal inicial. Pueden hacerse ciertas generalizaciones. Las hormonas polipeptídicas se unen generalmente a sus receptores específicos localizados en las membranas celulares. El receptor reconoce características estructurales de la hormona que generan un alto grado de especificidad y afinidad. Las constantes de afinidad de estas interacciones son del orden de 10^9–10^{11} M^{-1}, lo que indica una unión fuerte. Esta interacción normalmente activa o forma complejos en la membrana con una proteína transductora, tal como la proteína G (proteína fijadora de GTP), u otro transductor y provoca la activación de alguna función enzimática en el lado citoplasmático de la membrana. En algunos casos, los receptores experimentan una **internalización** hacia el interior de la célula; estos receptores pueden estar acoplados o no (p. ej., el receptor de la insulina) a proteínas transductoras en la membrana celular. En la Sección 21.11 se comenta la internalización de receptores. El complejo receptor "activado" podría, físicamente, abrir un canal iónico en la membrana o tener otros impactos profundos sobre la estructura y función de la membrana. Por ejemplo, la unión de la hormona al receptor puede provocar cambios conformacionales en la molécula de receptor que permitan su asociación con el transductor, en el que pueden tener lugar cambios conformacionales adicionales para permitir la interacción con un enzima en el lado citoplasmático de la membrana plasmática. Esta interacción puede inducir cambios conformacionales en un enzima que hacen que se active su sitio catalítico.

Las proteínas G actúan como transductores celulares de la señal hormonal

La mayoría de los transductores de receptores en la membrana plasmática son proteínas fijadoras de GTP que se denominan proteínas G. Las **proteínas G** constan de tres tipos de **subunidades—α, β y γ**. La **subunidad α** es el componente de fijación del nucleótido de guanina y se cree que interacciona indirectamente con el receptor a través de las subunidades β y γ, y, a continuación, directamente con un enzima, tal como la adenilato ciclasa, lo que da como resultado la activación del enzima. En realidad existen dos formas de la subunidad α, designadas α_s para la subunidad estimuladora y α_i para la subunidad inhibidora. Dos tipos de receptores, y por tanto de hormonas, controlan la reacción de la adenilato ciclasa: receptores hormonales que dan lugar a una estimulación de la adenilato ciclasa, y aquellos que dan lugar a una inhibición de la ciclasa. Esto se representa en la Figura 21.16, en la que se indica además el papel de α_s y α_i y alguna de las hormonas que interaccionan con los receptores estimulador e inhibidor.

En la Figura 21.17 se presenta los fenómenos que se producen cuando interaccionan hormona y receptor. La secuencia es como sigue: el receptor se une a la hormona en la membrana (Paso 1); esto produce un cambio conformacional en el receptor que deja expuesto un sitio para la fijación de proteína G (dímero β, γ) (Paso 2); la proteína G puede ser tanto estimuladora, G_s, como inhibidora, G_i, en relación con el efecto final sobre la actividad de la adenilato ciclasa; el receptor interacciona con el dímero β, γ de la proteína G permitiendo que la subunidad α intercambie el GDP unido por GTP (Paso 3); la disociación de GDP provoca la separación entre la subunidad α y el dímero β, γ y en la superficie de la subunidad α de la proteína G se origina un sitio de unión para la interacción con la adenilato ciclasa (Paso 4); la subunidad α se une a la adenilato ciclasa y activa el centro catalítico, de modo que el ATP es convertido en cAMP (Paso 5); el GTP se hidroliza a GDP por la actividad GTPasa de la subunidad α, devolviéndola a su conformación original y permitiendo de nuevo su interacción con la subunidad β, γ (Paso 6); el GDP se asocia con la subunidad α y el sistema retorna al estado no estimulado en espera de otro ciclo de actividad. Es importante destacar que hay pruebas que sugieren que los dímeros β, γ pueden desempeñar funciones importantes en la regulación de determinados factores, incluida la adenilato ciclasa.

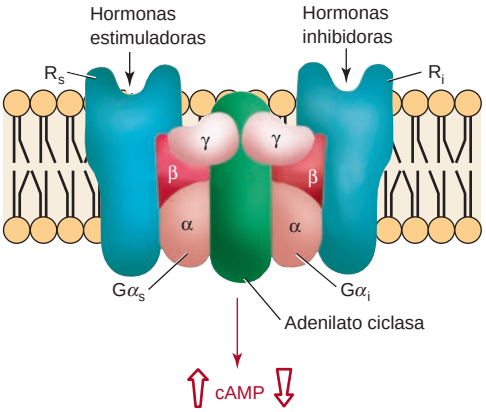


FIGURA 21.16
Componentes de un sistema adenilato ciclasa sensible a hormona.
La adenilato ciclasa convierte el ATP en cAMP. La ocupación de R_s por hormonas estimuladoras estimula la adenilato ciclasa a través de la formación de una subunidad $G\alpha_s$ disociada y activa. La ocupación de R_i por hormonas inhibidoras da como resultado la formación de un complejo $G\alpha_i$ "activo" y la consiguiente disminución de la actividad ciclante. No se conoce el destino de las subunidades β y γ en estas reacciones de disociación. R_s, receptor de la hormona estimuladora; R_i, receptor de la hormona inhibidora.

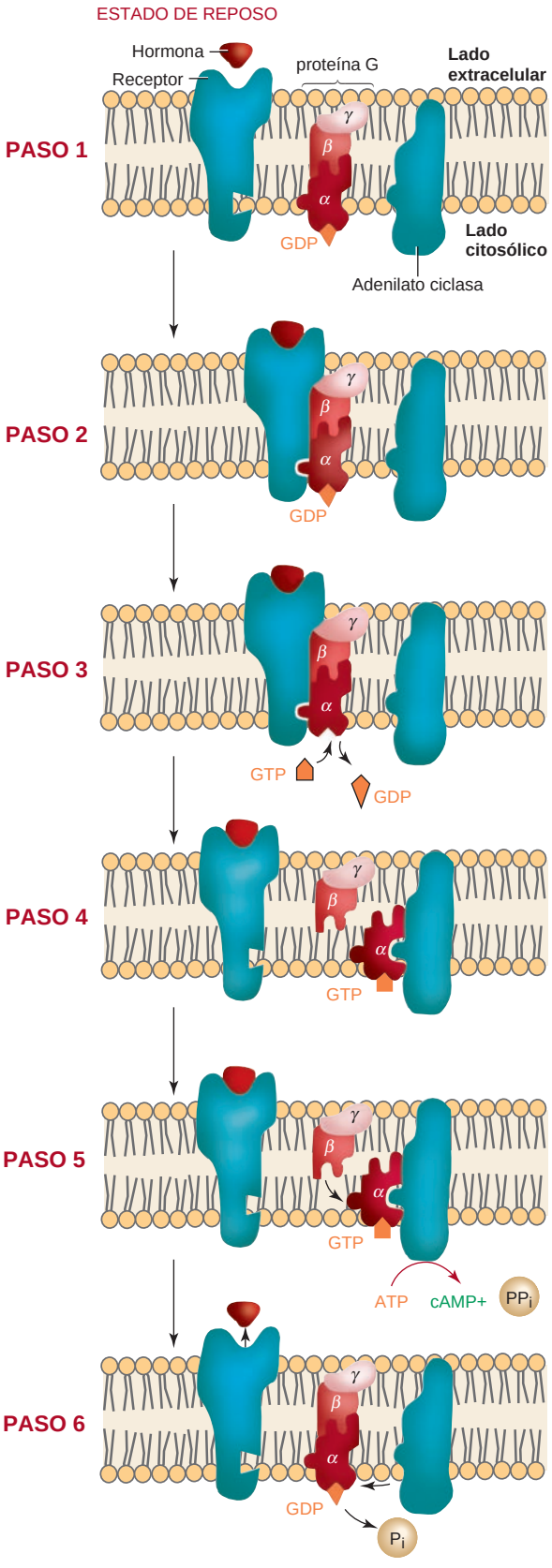


FIGURA 21.17
Activación de la adenilato ciclasa por unión de una hormona a su receptor. Se representa la membrana celular que contiene sobre su superficie externa una proteína receptora para una hormona. Sobre la superficie interna de la membrana se encuentra la proteína adenilato ciclasa y la proteína G transductora. En el estado de reposo se une GDP a la subunidad α de la proteína G. Cuando una hormona se une al receptor, se produce un cambio conformacional (Paso 1). El receptor activado se une a la proteína G (Paso 2), que activa a esta última, de modo que ésta libera GDP y une GTP (Paso 3) produciendo la disociación de la subunidad α y del complejo de las subunidades β y γ (Paso 4). La subunidad Gα libre se une a la adenilato ciclasa y la activa para que catalice la síntesis de cAMP a partir de ATP (Paso 5); este paso puede requerir un cambio conformacional en Gα. En algunos casos, el complejo β,γ puede jugar un papel importante en la regulación de ciertos efectores, incluida la adenilato ciclasa. Cuando el GTP se hidroliza en GDP, reacción catalizada muy probablemente por la propia Gα, ésta ya no es capaz de activar la adenilato ciclasa (Paso 6) y Gα y Gβ se reasocian. La hormona se disocia del receptor y el sistema vuelve a su estado de reposo.
Reproducido de Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. Molecular Cell Biology. *New York: Scientific American Books, 1986, p. 682.*

TABLA 21.6 Actividades transducidas por subfamilias de proteínas G

Subunidad α	*Expresión*	*Efector*
G_s	Ubicua	↑ Adenilato ciclasa, canal Ca^{2+}
G_{olf}	Olfativa	↑ Adenilato ciclasa
G_{+1} (transducina)	Fotorreceptores de los bastoncillos	↑ cGMP-fosfodiesterasa
G_{+2} (transducina)	Fotorreceptores de los conos	↑ cGMP-fosfodiesterasa
G_{i1}	Tejido neural > otros	↓ Adenilato ciclasa
G_{i2}	Ubicua	
G_{i3}	Otros tejidos > neural	
G_o	Tejido neural, endocrino	↓ Canal de Ca^{2+}
G_q	Ubicua	↑ Fosfolipasa C
G_{11}	Ubicua	
G_{14}	Hígado, pulmón, riñón	
$G_{15/16}$	Células sanguíneas	

Fuente: Adaptado de Spiegel, A.M., Shenker, A. y Weinstein, L. S. *Endocr. Rev.* 13:536, 1992.

En el caso en que una proteína G inhibidora se acople al receptor, los fenómenos son similares, pero la inhibición de la actividad adenilato ciclasa puede producirse por interacción directa de la subunidad α inhibidora con la adenilato ciclasa o, alternativamente, la subunidad α inhibidora puede interaccionar directamente con la subunidad α estimuladora del otro lado y evitar así indirectamente la estimulación de la actividad adenilato ciclasa. Existen pruebas inmunoquímicas que sugieren una multiplicidad de subtipos de G_i, y la clonación molecular de cDNA que codifican posibles subunidades α también ha proporcionado pruebas acerca de múltiples subtipos de α_i.

La purificación y caracterización bioquímica de proteínas G (G_s y G_i) ha revelado una diversidad insospechada en esta subfamilia. Clonaciones basadas en la reacción en cadena de la polimerasa han permitido identificar al menos 15 genes distintos que codifican las subunidades α en mamíferos. Respecto a las subunidades α, se obtiene una diversidad adicional por corte y empalme alternativo del gen α_s (cuatro formas). También parece existir diversidad entre las subunidades β y γ de mamífero. Se han descrito al menos cuatro cDNA de subunidades β distintos, y probablemente un número igual de subunidades γ. Lo que no está claro es cómo se combinan estos complejos para formar complejos β,γ distintos. Algunos datos sugieren que complejos β,γ distintos pueden poseer distintas propiedades en relación con las interacciones con la subunidad α y el receptor, si bien es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales para describir detalladamente estas interacciones especiales. En la Tabla 21.6 se presenta un listado de algunas actividades transducidas por subfamilias de proteínas G.

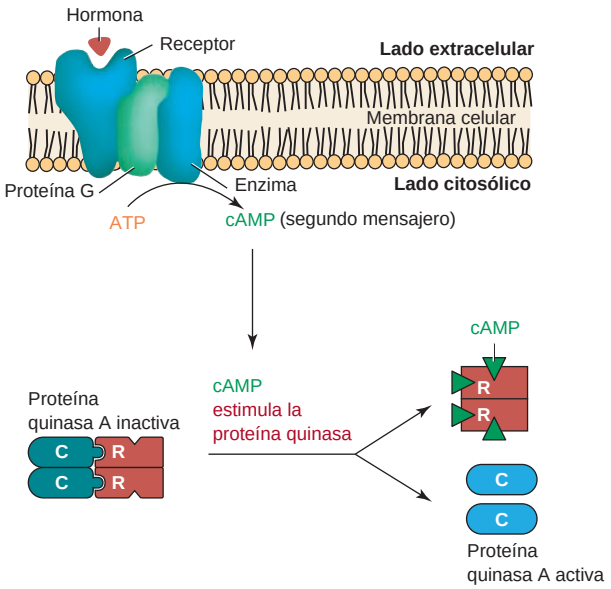


FIGURA 21.18
Activación de la proteína quinasa A.
Estimulación de la adenilato ciclasa mediada por hormona–receptor y posterior activación de la proteína quinasa A. C, subunidad catalítica; R, subunidad reguladora.

El AMP cíclico activa la ruta de la proteína quinasa A

La formación de cAMP en la célula normalmente activa la proteína quinasa A, lo que se denomina **ruta de la proteína quinasa A**. La ruta completa se presenta en la Figura 21.18. Se utilizan cuatro moléculas de cAMP en la reacción que forma un complejo con dos subunidades reguladoras (R), liberándose dos subunidades catalíticas (C) de la proteína quinasa. Las subunidades catalíticas liberadas son capaces de fosforilar proteínas para producir un efecto celular. En muchos casos, el efecto celular provoca la liberación de hormonas preformadas. Por ejemplo, la ACTH se une a receptores de membrana, eleva el nivel de **cAMP** intracelular, y libera cortisol desde las células de la zona fasciculada de la glándula adrenal mediante este mecanismo general. Tal como se muestra en la Figura 21.19, la ruta del cAMP interviene en una parte del mecanismo de liberación de hormonas tiroideas desde la glándula tiroidea. Se ha demostrado que la TSH estimula numerosos pasos clave en este proceso de secreción, entre ellos la captación de yoduro y la endocitosis de tiroglobulina (Figura 21.14). La ruta de la proteína quinasa A es también responsable de la liberación de testosterona por las células de Leydig testiculares, tal como se presenta en la Figura 21.20. Hay muchos otros ejemplos de acciones hormonales mediadas por cAMP y la ruta de la proteína quinasa A.

La formación de inositol trisfosfato conduce a la liberación de calcio a partir de reservas intracelulares

La captación de calcio extracelular a través de canales de calcio puede verse directamente afectada por la interacción hormona–receptor en la membrana celular. En algunos casos, parece ser que la interacción ligando–receptor abre directamente los

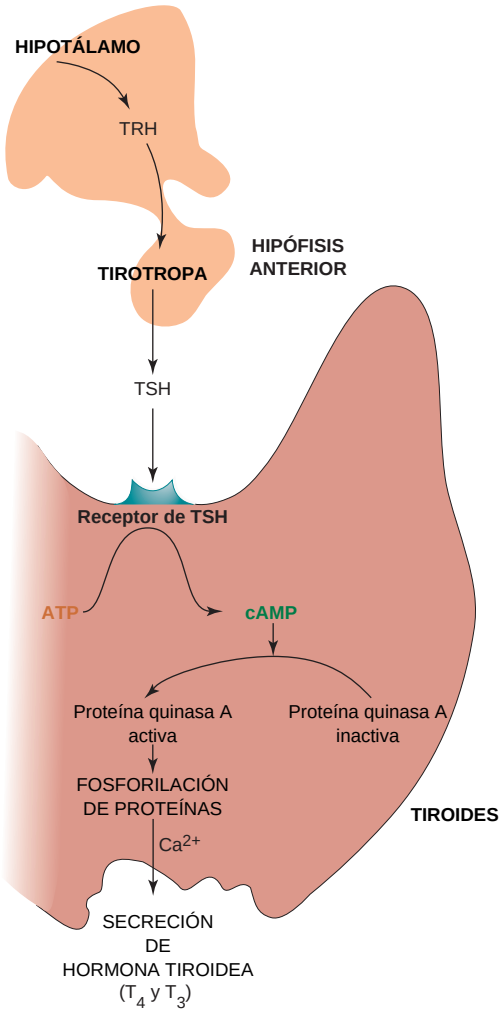


FIGURA 21.19
Efecto de la TSH sobre la secreción de hormona tiroidea.
La TSH estimula todos los pasos de la síntesis y secreción de T_3 y T_4. Estos efectos vienen mediados por la unión de hormona a los receptores de TSH localizados en la membrana basal de las células epiteliales tiroideas, el incremento de los niveles de cAMP y la consiguiente cascada de reacciones de fosforilación.

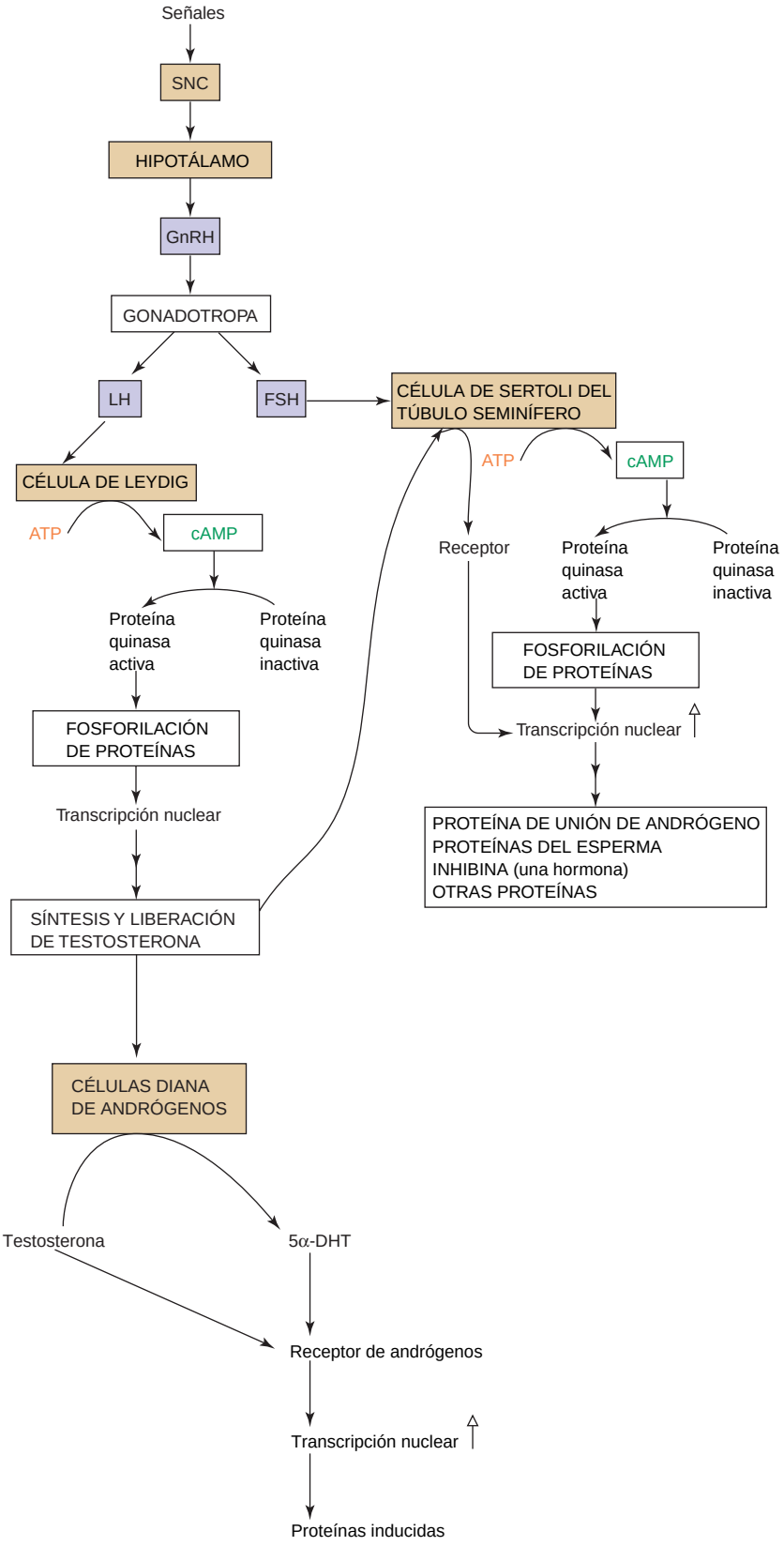


FIGURA 21.20
Visión global de los controles de secreción, algunas acciones generales de las gonadotropas y liberación de testosterona en el macho.
En algunas células diana de andrógenos, pero no en todas, la testosterona se reduce dando un andrógeno más potente, la 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT).

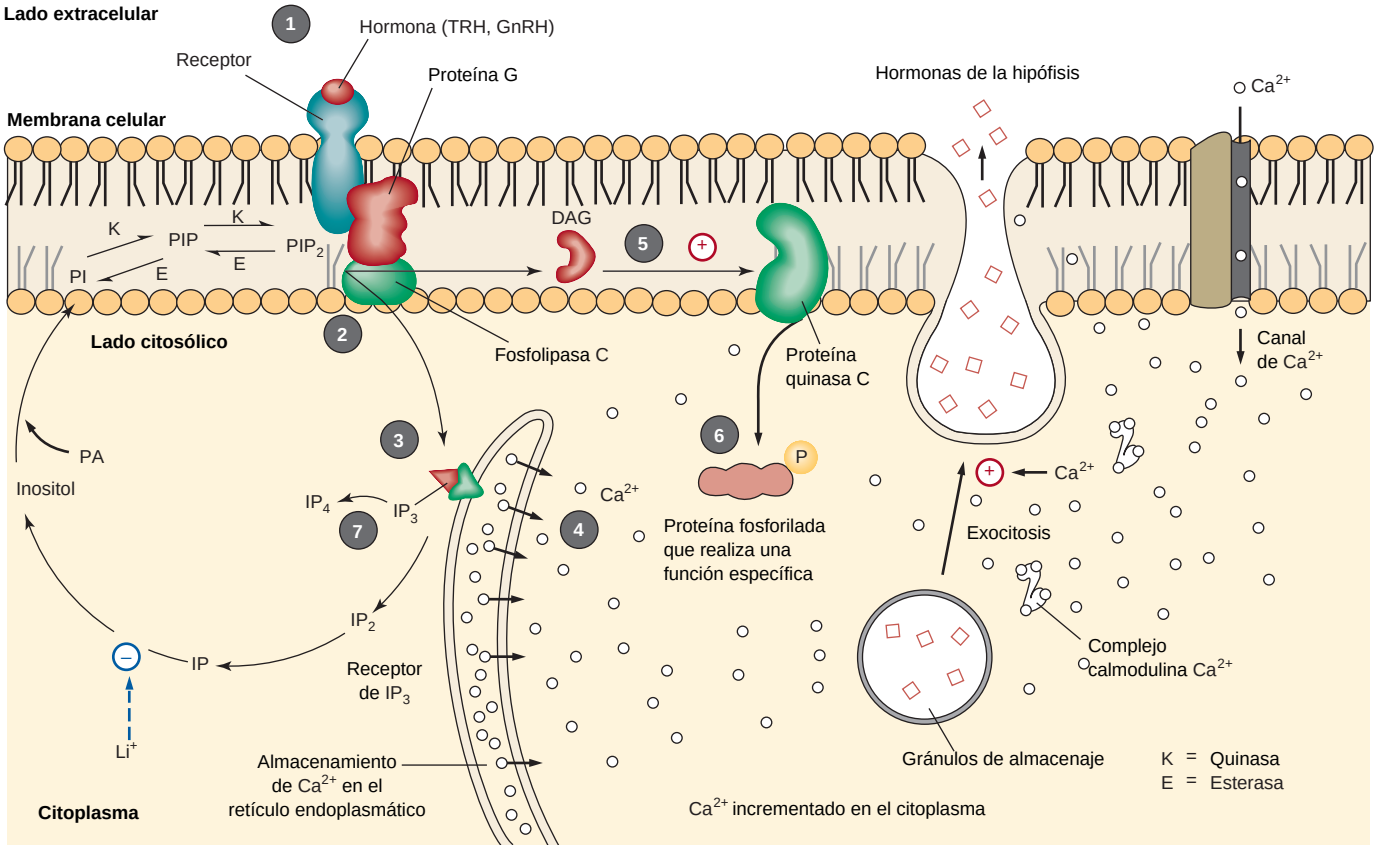


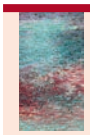
FIGURA 21.21
Visión global de las señales hormonales que dan lugar a los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) a través del sistema del fosfatidilinositol.
La acción de IP_3 es incrementar los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} por un fenómeno mediado por receptor en el almacén celular de calcio. Los pasos de la ruta son: (1) unión de la hormona al receptor de la membrana celular; (2) producción de IP_3 a partir de PIP_2; (3) unión de IP_3 al receptor del lugar de almacén de calcio; (4) liberación de calcio libre al citosol; (5) liberación de DAG y consiguiente unión a la proteína quinasa C; (6) fosforilación de sustratos proteicos por acción de la proteína quinasa C activada por DAG y Ca^{2+}; y (7) fosforilación de IP_3 para dar lugar a IP_4. DAG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; IP, inositol fosfato; IP_2, inositol bisfosfato; IP_3, inositol 1,4,5-trisfosfato; IP_4, inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato; PIP, fosfatidilinositol fosfato; PIP_2, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; K, quinasa; E, esterasa.

canales de calcio en la membrana celular (véase p. 516). Otro sistema para incrementar la concentración intracelular de Ca^{2+} proviene de la activación de **fosfolipasa C** transducida por una proteína G, previa interacción hormona–receptor (Figura 21.21).

Una hormona que funciona a través de este sistema se une a un receptor específico de la membrana celular, que interacciona con una proteína G según un mecanismo similar al de la ruta de la proteína quinasa A y transduce la señal, lo que da como resultado la estimulación de la fosfolipasa C. Este enzima cataliza la hidrólisis de **fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato** (PIP_2) para formar dos **segundos mensajeros**, **diacilglicerol (DAG)** e **inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3)**.

IP_3 difunde hacia el citosol y se une a un receptor de IP_3 en la membrana de un depósito particulado de **calcio**, que puede estar separado del retículo endoplasmático, o bien formar parte del mismo. La unión de IP_3 da como resultado la liberación de iones calcio, que contribuye a un gran incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico. Los iones calcio son importantes en la exocitosis al facilitar la fusión de gránulos secretores con el lado citoplasmático de la membrana plasmática, en la agregación de microtúbulos o en la función de proteínas contráctiles, que pueden formar parte de la estructura del mecanismo exocitótico, o bien en todos los procesos anteriores.

El IP_3 se metaboliza por eliminación progresiva de grupos fosfato (Figura 21.21) hasta formar inositol. Éste se combina con ácido fosfatídico (PA) para formar fosfatidilinositol (PI) en la membrana celular. El PI es fosforilado doblemente por una



APLICACIÓN CLÍNICA 21.3

Tratamiento de la enfermedad maníaco-depresiva con litio: ciclo del fosfatidilinositol

El litio ha sido utilizado durante años en el tratamiento de la depresión maníaca. Los datos más recientes sugieren que en la terapia con litio interviene la ruta del fosfatidilinositol (PI). Esta ruta genera los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol tras la interacción hormona/neurotransmisor–receptor de membrana, e implica la intervención del complejo de la proteína G y la activación de la fosfolipasa C. El IP_3 y sus distintos derivados fosforilados son al fin desfosforilados de forma progresiva para dar lugar a inositol libre. Éste es utilizado a continuación para la síntesis de fosfatidilinositol monofosfato. El Li^+ inhibe la fosfatasa que desfosforila el IP a inositol. Además, el Li^+ puede también interferir directamente con la función de la proteína G. El resultado de esta inhibición del Li^+ es que el ciclo del PI se enlentece de forma importante, incluso en condiciones de estimulación continua de hormona/neurotransmisor, y la célula se vuelve menos sensible a tales estímulos. La enfermedad maníaco–depresiva puede aparecer por exceso de actividad de ciertas células del SNC, tal vez como resultado de niveles anormalmente elevados de hormonas o neurotransmisores cuya función es la estimulación del ciclo del PI. El efecto quimioterapéutico del Li^+ puede consistir en la disminución de la respuesta celular a niveles elevados de agentes que, a su vez, pueden promover aumentos en los niveles del ciclo del PI y desencadenar la depresión maníaca.

Avissar, S. y Schreiber, G. Muscarinic receptor subclassification and G-proteins: significance for lithium action in affective disorders and for the treatment of the extrapyramidal side effects of neuroleptics. *Biol. Psychiatry* 26:113, 1989; Hallcher, L. M. y Sherman, W. R. The effects of lithium ion and other agents on the activity of myoinositol 1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255:896, 1980; y Pollack, S. J., Atack, J., Knowles, M. R., McAllister, G., Ragan, C. I., Baker, R., Fletcher, S. R., Iversen, L. L. y Broughton, H. B. Mechanism of inositol monophosphatase, the putative target of lithium therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5766, 1994.

quinasa para formar PIP_2, que bajo estímulo hormonal ya puede entrar en otra ronda de hidrólisis y formación de segundos mensajeros (DAG e IP_3). Si el receptor todavía está ocupado por una hormona, pueden producirse varias rondas del ciclo antes de que se disocie el complejo hormona–receptor, o que alguna otra característica del ciclo pase a ser limitante. Es interesante constatar que el **ion litio** (Li^+) inhibe la conversión de inositol fosfato a inositol (Figura 21.21). Esto podría constituir la base metabólica de los efectos beneficiosos del Li^+ en la enfermedad maníaco-depresiva (véase Apli. Clín. 21.3). Por último, es importante destacar que no todo el IP_3 generado es desfosforilado durante la estimulación hormonal. Parte del IP_3 es fosforilado mediante la IP_3 quinasa para dar lugar a inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato (IP_4), que puede mediar algunas de las respuestas hormonales más lentas o prolongadas, o bien facilitar el abastecimiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} a partir del fluido extracelular, o realizar ambas funciones.

El diacilglicerol activa la ruta de la proteína quinasa C

A la vez que el IP_3 formado por la hidrólisis de PIP_2 aumenta la concentración de Ca^{2+} en el citosol, el otro producto de la hidrólisis, el DAG, produce efectos distintos. A destacar, el DAG activa una importante proteína quinasa de serina/treonina denominada proteína quinasa C por su dependencia de Ca^{2+} (en la p. 948 se trata esta proteína quinasa). El aumento inicial del Ca^{2+} citosólico inducido por IP_3 parece alterar de algún modo la proteína quinasa C, de modo que ésta se transloca desde el citosol hacia la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Una vez translocada, es activada por una combinación de Ca^{2+}, DAG y el fosfolípido de membrana cargado negativamente, la fosfatidilserina. Tras su activación, la proteína quinasa C fosforila proteínas específicas en el citosol o, en ocasiones, en la membrana plasmática. Estas proteínas fosforiladas pueden ser o activadas, o inactivadas mediante la fosforilación. Por ejemplo, una proteína fosforilada podría migrar hasta el núcleo y estimular la mitosis y el crecimiento. También es posible que una proteína fosforilada pueda jugar un papel en la secreción de hormonas preformadas.

21.8 SISTEMAS CÍCLICOS DE CASCADA HORMONAL

Los sistemas de cascada hormonal pueden inducirse mediante señales tanto externas como internas. Ejemplos de ello son las **variaciones diurnas** de los niveles de cortisol secretado por la corteza adrenal, iniciadas probablemente por la serotonina y la vasopresina, las variaciones en la secreción de melatonina desde la glándula pi-

neal y la regulación interna del ciclo ovárico. Algunos de estos biorritmos funcionan de forma cíclica, a menudo dictados por la luz diurna y la oscuridad, y se les denomina **control cronotrópico** de la secreción hormonal.

La síntesis de melatonina y serotonina está controlada por ciclos de luz y oscuridad

La liberación de melatonina desde la glándula pineal, que se presenta en la Figura 21.22, es un ejemplo de biorritmo. En éste, al igual que en otros sistemas similares, la señal interna es proporcionada por un neurotransmisor, en este caso, la noradrenalina producida por una neurona adrenérgica. En este sistema, el control está ejercido por la luz que entra por los ojos y se transmite a la glándula pineal a través del SNC. La neurona adrenérgica, que inerva el pinealocito, es inhibida por la luz transmitida a través de los ojos. La noradrenalina liberada como neurotransmisor en la oscuridad estimula la formación de cAMP a través de un receptor β en la membrana celular del pinealocito, lo que da lugar a la síntesis elevada de la ***N*-acetiltransferasa**. El incremento en la actividad de esta enzima produce la conversión de **serotonina** a ***N*-acetilserotonina** y la **hidroxiindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT)**, cataliza a continuación la conversión de *N*-acetilserotonina en **melatonina**, la cual se secreta en las horas nocturnas, pero no durante las diurnas. Las células sensibles a melatonina contienen receptores que generan efectos en la reproducción y otras funciones. Por ejemplo, la melatonina produce un efecto antigonadotrópico, aunque el significado fisiológico de este efecto es poco conocido.

El ciclo del ovario está controlado por la hormona liberadora de gonadotropina

Un ejemplo de mecanismo de liberación pulsátil es la regulación de la liberación periódica de GnRH. Un control periódico regula la liberación de GnRH en períodos definidos (de aproximadamente 1 h en los animales superiores), liberación que está controlada por neuronas aminérgicas, que pueden ser de naturaleza adrenérgica (que secretan noradrenalina). El inicio de esta función se produce en la pubertad y tiene importancia tanto en el varón como en la hembra. Mientras que el sistema del varón funciona continuamente, el sistema femenino es periódico, y se conoce como **ciclo del ovario**. Este sistema se presenta en la Figura 21.23. En el varón, el centro cíclico en el SNC no se desarrolla porque su desarrollo está bloqueado por andró-

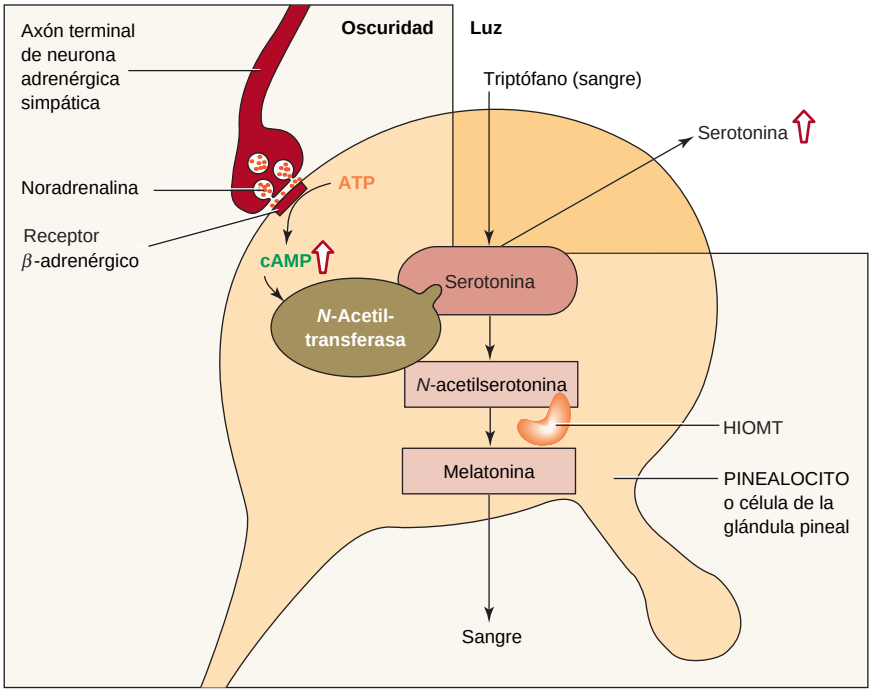


FIGURA 21.22
Biosíntesis de melatonina en los pinealocitos. HIOMT, hidroxiindol-*O*-metiltransferasa. *Reproducido de Norman, A. W. y Litwack, G.* Hormones. *New York: Academic Press, 1987, p. 710.*

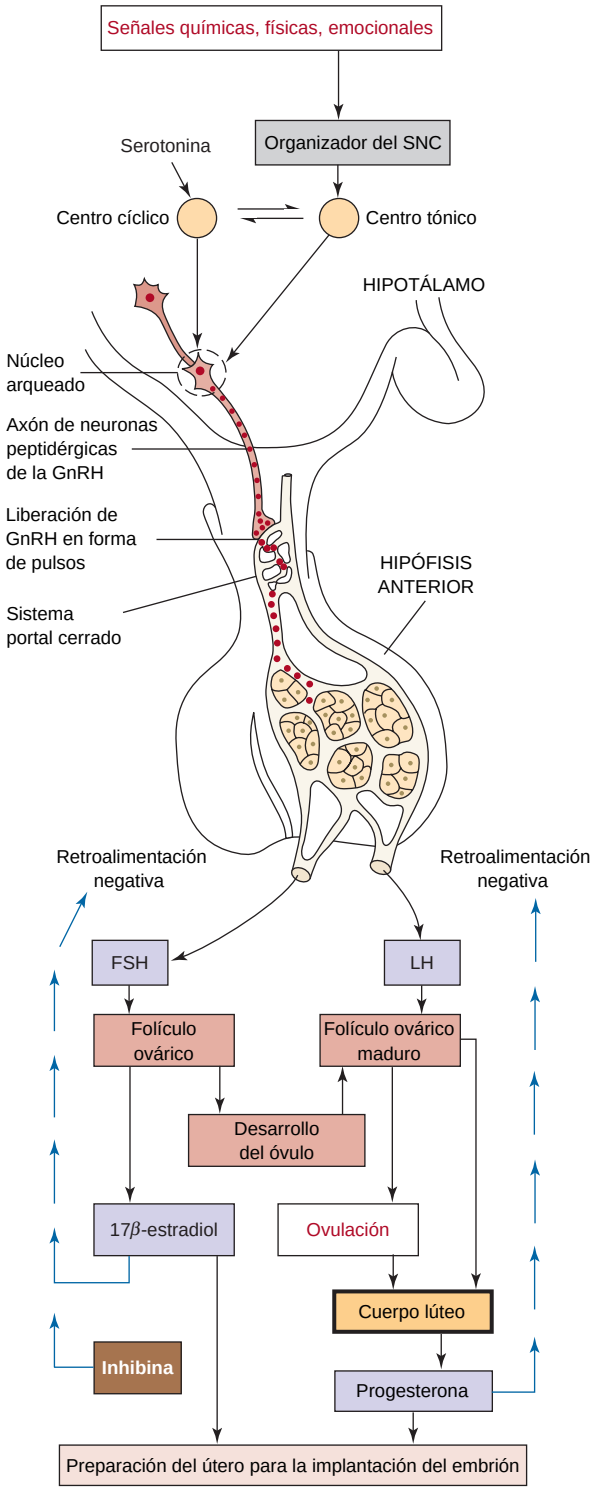


FIGURA 21.23
Ciclo del ovario en relación con la generación de hormona hipotalámica, hormonas gonadotrópicas de la hipófisis y hormonas sexuales.
Para empezar el ciclo en la pubertad, varios centros del SNC se coordinan con el hipotálamo para que pueda liberarse GnRH en forma de pulsos. Esto produce la liberación de LH y FSH, las cuales a su vez afectan al folículo ovárico, a la ovulación y al cuerpo lúteo. La hormona inhibina inhibe selectivamente la secreción de FSH. Los productos del folículo y del cuerpo lúteo son β-estradiol y progesterona, respectivamente. GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; FSH, hormona estimuladora del folículo; LH, hormona luteinizante.

genos antes del nacimiento. En la hembra, ha de organizarse un conjunto complejo de señales en el SNC antes de que se produzca la secreción inicial de GnRH en la pubertad. Los centros superiores (organizador del SNC) han de entrar en armonía con los centros tónico y cíclico, y éstos han de interaccionar entre sí para preparar el hipotálamo. El sistema pulsátil, que inerva el núcleo arqueado del hipotálamo, también ha de entrar en funcionamiento para que se libere GnRH; aparentemente este sistema ha de ser funcional a lo largo de toda la vida para que estos ciclos se mantengan. A la liberación de GnRH desde los terminales axónicos de las células que la sintetizan sigue la entrada de hormona en el plexo primario del sistema portal ce-

rrado que conecta el hipotálamo con la hipófisis anterior (Figura 21.23). En este proceso, la barrera hematoencefálica, que impide el transporte de péptidos, se supera permitiendo que la GnRH entre en el sistema vascular a través de ventanales o aperturas en los vasos sanguíneos, que permitan dicho transporte. A continuación, la GnRH recorre el **sistema portal** y abandona el plexo secundario, de nuevo, a través de ventanales situados en la región de las células diana (**gonadotropas**) de la hipófisis anterior. La hormona se une a su receptor de membrana específico y la señal, a través del sistema metabólico del fosfatidilinositol, provoca la liberación de FSH y LH a partir de la misma célula. La **FSH** se une a su receptor de membrana específico sobre el folículo del ovario y, actuando a través de la ruta de la proteína quinasa A por aumento de cAMP, estimula la síntesis y secreción de la hormona sexual femenina, 17β-estradiol, y la maduración del folículo y del óvulo. También se sintetizan otras proteínas, tales como la **inhibina**. La inhibina es un retrorregulador negativo de la producción de FSH en la célula gonadotropa. Cuando el folículo y el óvulo están completamente maduros, la LH se une a su receptor específico y participa en la ovulación junto con otros factores, tales como la prostaglandina $F_{2\alpha}$. Después de la ovulación, el folículo residual se convierte en el cuerpo lúteo funcional bajo el control primario de la LH (Figura 21.23). La **LH** se une a su receptor específico en la membrana celular del cuerpo lúteo y, a través de la estimulación de la ruta de la proteína quinasa A, estimula la síntesis de progesterona, la hormona progestante. El **estradiol** y la **progesterona** se unen a receptores intracelulares (véase Capítulo 22) en el endometrio uterino y provocan cambios importantes, que dan como resultado el engrosamiento y la vascularización de la pared, preparándola así para la implantación del huevo fertilizado. El estradiol, que se sintetiza en grandes cantidades antes de la producción de progesterona, induce el receptor de progesterona como uno de sus fenotipos inducibles. Esta inducción de los receptores de progesterona prepara el útero para una posterior estimulación con la progesterona.

Ausencia de fertilización

Si la fertilización del óvulo no se produce, el cuerpo lúteo involuciona debido a la disminución en el aporte de LH. Los niveles de progesterona en la sangre decaen bruscamente con el colapso del cuerpo lúteo. Los niveles de estradiol también decaen, ya que cesa su producción por parte del cuerpo lúteo. De este modo, los estímulos para el engrosamiento y vascularización de la pared del endometrio uterino se pierden. La menstruación se produce a través de un proceso de apoptosis (muerte celular programada) de las células del endometrio uterino hasta que éste alcanza su estado no estimulado. Finalmente, la caída de los niveles de esteroides en la sangre libera la retroinhibición negativa sobre las células gonadotropas e hipotálamo, y el ciclo comienza de nuevo con la liberación de FSH y LH por las células gonadotropas en respuesta a la GnRH.

El curso del ciclo del ovario se muestra en la Figura 21.24 respecto de la concentración relativa en la sangre de las hormonas liberadas desde el hipotálamo, hipófisis anterior, folículo ovárico y cuerpo lúteo. Se muestran, además, los cambios en la maduración del folículo y del óvulo, así como en la del endometrio uterino. El papel de las hormonas esteroides, estradiol y progesterona, se trata en el Capítulo 22.

El ciclo se inicia por primera vez en la pubertad, cuando se libera GnRH; ello corresponde al día 1 en la Figura 21.24. La GnRH se libera de forma pulsátil y provoca la liberación de FSH y LH por parte de las células gonadotropas; en los días sucesivos se produce un incremento de la concentración de estas hormonas gonadotrópicas en la sangre. Bajo el estímulo de la FSH, el folículo empieza a madurar (parte inferior de la Figura 21.24), lo que produce estradiol (E_2). En respuesta al estradiol, el endometrio uterino comienza a engrosarse (no se habrá producido menstruación previa en el primer ciclo). Con el tiempo, bajo la acción prolongada de la FSH, el folículo madura junto con el óvulo, también en maduración, y se producen concentraciones de estradiol extraordinariamente altas (alrededor del día 13 del ciclo). Estos niveles de estradiol, en lugar de producir retroinhibición, generan ahora, mediante **retroestimulación**, una gran liberación de LH y, en menor medida, de FSH a partir de la célula gonadotropa. La FSH responde en menor medida debido a la producción de inhibina por parte del ovario bajo el estímulo de la FSH. La inhibina es un retroinhibidor negativo específico de la FSH pero no de la LH, probablemente porque suprime la síntesis de la subunidad β de la FSH. El pico de LH a mitad del ciclo se conoce como "punta de LH". La ovulación se produce alrededor del día 14 (mitad del ciclo)

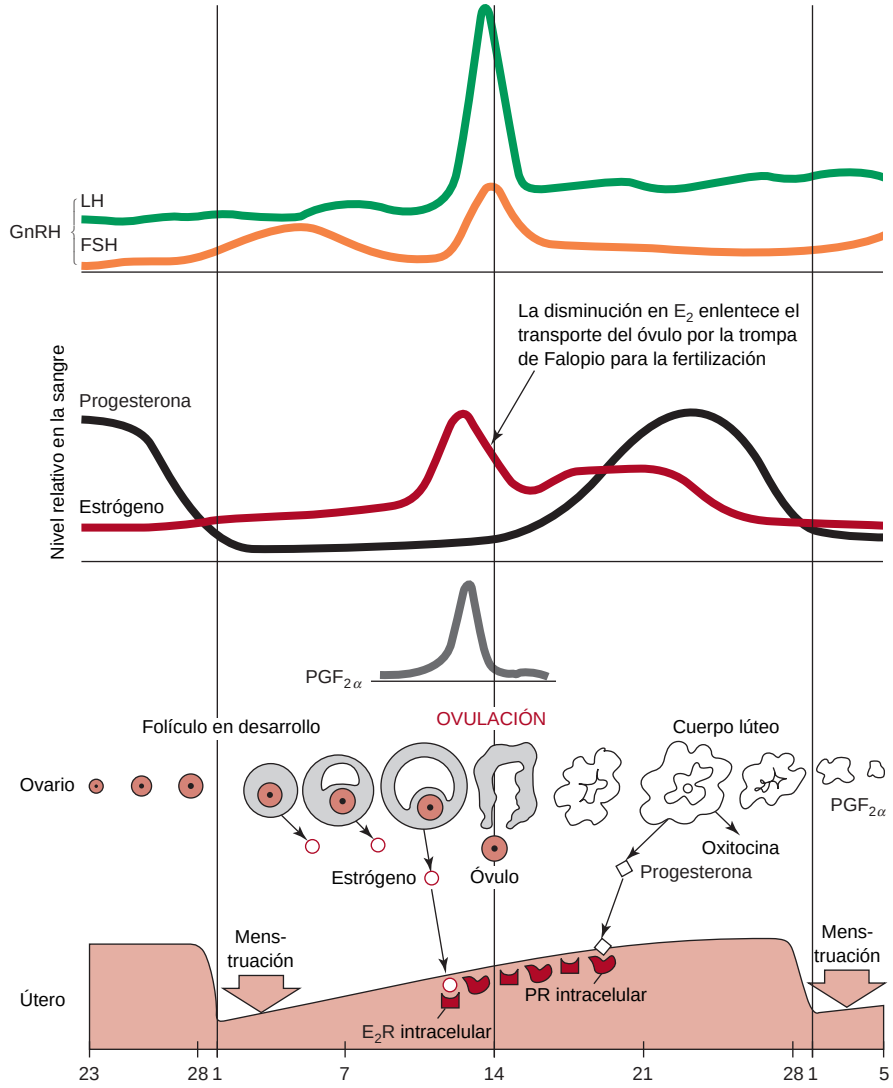


FIGURA 21.24
El ciclo del ovario.
En el diagrama superior se muestran los niveles relativos de GnRH, LH, FSH, progesterona, estrógeno y $PGF_{2\alpha}$ en la sangre. En el diagrama inferior se representan los fenómenos que se producen en el folículo ovárico, cuerpo lúteo y endometrio uterino. GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimuladora del folículo; $PGF_{2\alpha}$, prostaglandina $F_{2\alpha}$; E_2, estradiol; E_2R, receptor de estrógeno intracelular; y PR, receptor de progesterona intracelular.

por efecto de la elevada concentración de LH junto con otros factores, tales como la $PGF_{2\alpha}$. Tanto la LH como la $PGF_{2\alpha}$ actúan sobre receptores de la membrana celular. Después de la ovulación, la función del folículo declina, tal como se refleja en la disminución de concentración de estrógeno en la sangre. El folículo consumido se diferencia a continuación en cuerpo lúteo funcional inducido por los niveles todavía elevados de LH en la sangre (Figura 21.24, parte superior). Bajo la influencia de los elevados niveles de estradiol (estrógeno) anteriores y de los elevados niveles de progesterona producida por el cuerpo lúteo ahora funcional, la pared del endometrio uterino alcanza su máximo desarrollo, preparándose así para la implantación del huevo fertilizado si se produce fertilización. Nótese que la previa disponibilidad de estradiol en combinación con el receptor de estrógeno (E_2R) da lugar a elevados niveles de receptor de progesterona (PR) en las células de la pared del útero. Los niveles de estrógeno en la sangre decaen con la pérdida de función del folículo, aunque el cuerpo lúteo produce una cierta cantidad de estrógeno, además de cantidades muy superiores de progesterona. En ausencia de fertilización, el cuerpo lúteo continúa funcionando durante aproximadamente 2 semanas y, a continuación, involuciona debido a la pérdida de niveles elevados de LH. La producción de oxitocina por el propio cuerpo lúteo y la producción o disponibilidad de $PGF_{2\alpha}$ inhibe la síntesis de progesterona y favorece la luteólisis mediante un proceso de muerte celular programada (véase p. 985). Con la muerte del cuerpo lúteo se produce un profundo declive de los niveles de estradiol y progesterona en la sangre, de modo que no puede mantenerse por más tiempo el engrosamiento de la pared del endometrio y tiene lugar la menstruación, seguida por el inicio de otro ciclo con un nuevo folículo en desarrollo.

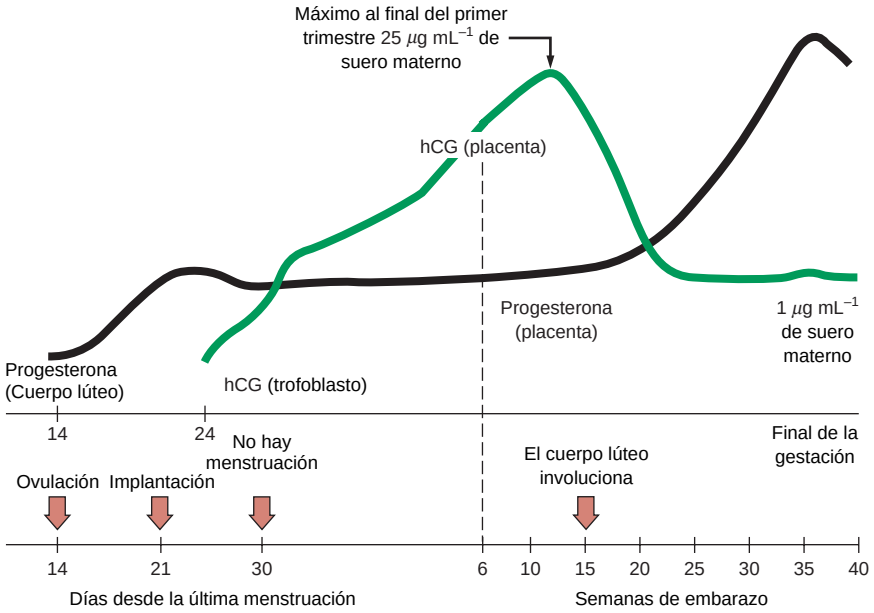


FIGURA 21.25
Efecto de la fertilización sobre el ciclo del ovario en relación con la progesterona y la secreción de gonadotropina coriónica humana (hCG).

Fertilización

Tal como se muestra en la Figura 21.25, la situación cambia si se produce fertilización. El cuerpo lúteo, cuya función habría cesado al cabo de 28 días permanece viable debido a la producción en el trofoblasto de **gonadotropina coriónica** (CG), que se asemeja y actúa como la LH del trofoblasto. Con el tiempo, la producción de **gonadotropina coriónica humana** (hCG) es asumida por la placenta, que continúa la producción de niveles muy elevados de hormona durante la mayor parte del período gestante. No obstante, el cuerpo lúteo, conocido como "cuerpo lúteo del embarazo", muere con el tiempo y al cabo de aproximadamente 12 semanas de embarazo la placenta ha asumido la producción de progesterona que se secreta a elevados niveles a lo largo del embarazo. Aunque la progesterona y el estrógeno se secretan en cantidades progresivamente más elevadas a lo largo del embarazo, a partir del séptimo mes la secreción de estrógeno continúa aumentando, mientras que la de progesterona se mantiene constante o incluso puede disminuir ligeramente (Figura 21.25). El aumento en la producción de una proteína de unión a progesterona puede también servir para disminuir la concentración efectiva de progesterona libre en el miometrio. Así, la relación estrógeno/progesterona aumenta hacia el final del embarazo y puede ser en parte responsable del aumento de contracciones uterinas. La oxitocina secretada por la hipófisis posterior también contribuye a la aparición de estas contracciones uterinas. Las membranas fetales también liberan prostaglandinas ($PGF_{2\alpha}$) en el momento del parto, aumentando también la intensidad de las contracciones uterinas. Finalmente, las glándulas adrenales fetales secretan cortisol, que no sólo estimula la maduración del pulmón fetal al inducir tensioactivo pulmonar sino que también puede estimular las contracciones uterinas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el varón el sistema es similar aunque menos complejo, en el sentido de que no progresa de forma cíclica, sino más bien tal como se representa en la Figura 21.25.

21.9 | INTERACCIONES HORMONA–RECEPTOR

Los receptores son proteínas que se diferencian entre sí por su especificidad por el ligando y por su localización en la célula (véase Figura 21.1). La interacción de ligando con el receptor se parece esencialmente a una reacción semienzimática:

$$\text{Hormona} + \text{receptor} \rightleftharpoons \text{complejo hormona–receptor}$$

El **complejo hormona–receptor** experimenta normalmente cambios conformacionales a consecuencia de la interacción con el ligando hormonal. Estos cambios permiten una interacción posterior con una proteína transductora (proteína G) a nivel de membrana o la activación a un nuevo estado en el cual los dominios activos pasan a estar disponibles sobre la superficie del receptor. El tratamiento matemático de la interacción entre hormona y receptor es una función de las concentraciones de los reactivos, hormona [H] y receptor [R] en la formación del complejo hormona–receptor [RH] y de las velocidades de formación y rotura del complejo en la reacción:

$$[H] + [R] \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} [RH]$$

La reacción puede estudiarse en condiciones, tales como baja temperatura, en las que se reduzcan reacciones posteriores del complejo hormona–receptor. El equilibrio puede, por lo tanto, expresarse en términos de la constante de asociación, K_a, que es igual al inverso de la constante de disociación, K_d:

$$K_a = \frac{[RH]}{[H][R]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{1}{K_d}$$

Las concentraciones son concentraciones de equilibrio que pueden expresarse en términos de las constantes de velocidad de formación y de rotura del complejo, siendo k_{+1} la de formación y k_{-1} la de rotura del complejo (es decir, asociación de la hormona con el receptor y disociación de la hormona, respectivamente). Experimentalmente, el equilibrio bajo ciertas condiciones se determina mediante una curva de progreso de la unión hasta alcanzar la saturación. La cantidad saturante de hormona se determina utilizando cantidades variables de hormona libre y midiendo la cantidad unida mediante un ensayo adecuado. La mitad del valor máximo de una gráfica de hormona unida a receptor (ordenada) respecto a concentración total de hormona libre (abscisa) se aproxima a la constante de disociación, cuyo valor será una concentración específica de hormona expresada en molaridad. La hormona unida a receptor se corrige respecto a la unión inespecífica de hormona a la membrana u otras proteínas intracelulares no receptoras. Si la hormona está marcada radiactivamente, la unión inespecífica puede medirse adecuadamente determinando la unión a receptor usando hormona marcada ("caliente" o "no competida") y la unión a receptor usando hormona marcada después de la adición de un exceso (100–1000 veces) de hormona no marcada ("caliente" + "fría" o competida). El exceso de hormona no marcada desplazará la hormona marcada de los sitios de unión de alta afinidad, pero no de aquellos sitios inespecíficos de baja afinidad. Así, cuando se resta la curva "competida" de la curva "no competida", como se muestra en la Figura 21.26, se obtiene una curva intermedia que representa la unión específica de la hormona marcada al receptor. Esto tiene una importancia crucial cuando se mide un receptor en un sistema que contiene otras proteínas. Normalmente, alrededor de 20 veces el valor de K_d en hormona es suficiente para saturar el receptor.

El análisis de Scatchard permite determinar el número de sitios de unión del receptor y la constante de asociación para el ligando

La mayoría de las determinaciones de K_d se llevan a cabo mediante el **análisis de Scatchard**, que es un tratamiento matemático de la ecuación de equilibrio. La ecuación presenta varios desarrollos posibles, y también puede considerarse a partir del análisis de acción de masas de la ecuación mostrada anteriormente. En el equilibrio, el número total de posibles sitios de unión ($B_{máx}$) es igual al número de sitios unidos más sitios libres, de modo que $B_{máx} = R + RH$, siendo los sitios libres $R = B_{máx} - RH$. Al considerar los sitios libres en la reacción, la ecuación de equilibrio pasa a ser

$$K_a = \frac{[RH]}{[H](B_{máx} - [RH])}$$

Así,

$$\frac{\text{unida}}{\text{libre}} = \frac{[RH]}{[H]} = K_a(B_{máx} - [RH]) = \frac{1}{K_d}(B_{máx} - [RH])$$

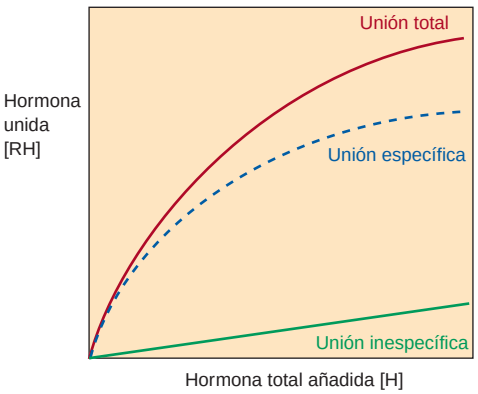


FIGURA 21.26
Gráfica característica que muestra la unión hormonal específica.

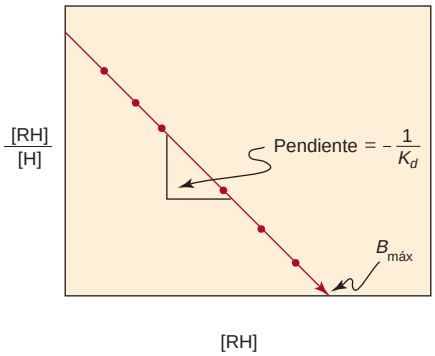
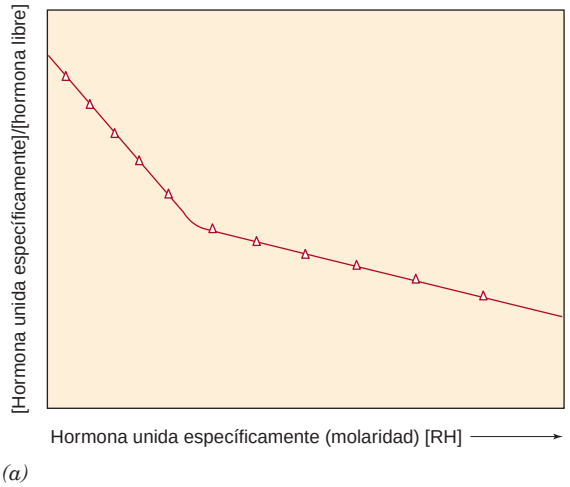


FIGURA 21.27
Gráfica característica del análisis de Scatchard de la unión específica entre ligando y receptor.

La representación de Scatchard de unida/libre = [RH]/[H] en ordenadas frente a unida [RH] en abscisas se ajusta a una recta, tal como se muestra en la Figura 21.27. Cuando la recta se extrapola hasta la abscisa, la intersección da el valor de $B_{máx}$ (el número total de sitios de unión específicos de receptor). La pendiente de la recta (negativa) es $-K_a$ o $-1/K_d$.

Estos análisis son suficientes para la mayoría de los sistemas, pero se hacen más complejos cuando en la representación de Scatchard participan dos componentes. En este caso, la recta generalmente se curva a medida que se aproxima a la abscisa, y se observa una segunda fase, algo asintótica con respecto a la abscisa, aún manteniendo una pendiente negativa (Figura 21.28*a*). Para obtener el verdadero valor de K_d para los sitios de alta afinidad (de mayor pendiente), la curva de baja afinidad ha de restarse del primer conjunto de datos, por lo que también se corrige el valor extrapolado de $B_{máx}$. A partir de estos análisis se obtiene información sobre la K_d, el número de clases de sitios de unión (normalmente uno o dos) y el número máximo de sitios de receptor de alta afinidad (número de receptores) en el sistema (véase Figura 21.28*b*). Estas gráficas de Scatchard curvilíneas son el resultado no sólo de la existencia de más de un componente de unión distinto, sino también consecuencia de la denominada cooperatividad negativa. Este término se refiere al hecho de que en algunos sistemas la afinidad del receptor por su ligando se ve gradualmente disminuida a medida que se produce la unión de más ligando. Tras la aplicación de este análisis a una gran variedad de sistemas parece que los valores



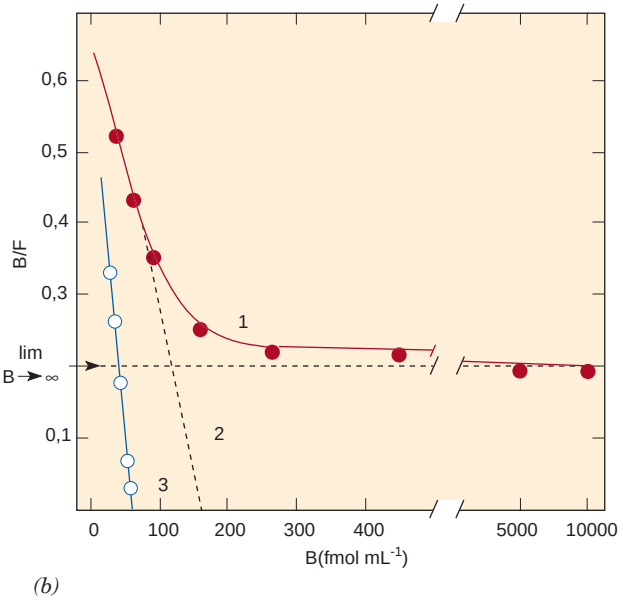


FIGURA 21.28
Análisis de Scatchard de curvas que presentan dos componentes que se unen.
(*a*) Curva de Scatchard que muestra dos componentes. (*b*) Gráfica de Scatchard con corrección del componente de alta afinidad obtenida restando la unión no específica atribuible al componente de baja afinidad. Curva 1: Unión total. Curva 2: Extrapolación lineal del componente de alta afinidad que incluye la contribución del componente de baja afinidad. Curva 3: Unión específica del componente de alta afinidad tras eliminar la contribución no específica.
Reproducido de Chamness, G. C. y McGuire, W. L. Steroids *26:538, 1975.*

de K_d para muchos receptores hormonales está comprendido entre 10^{-9} y 10^{-11} M, lo que indica una unión muy fuerte. Estas interacciones se caracterizan generalmente por un alto grado de especificidad, de modo que ambos parámetros describen interacciones de un orden elevado, lo que indica la singularidad de los receptores y la selectividad de la recepción de señal.

En algunas interacciones hormona–receptor intervienen múltiples subunidades hormonales

Las hormonas de la hipófisis anterior **tirotropina (TSH)**, **hormona luteinizante (LH)** y **hormona estimuladora del folículo (FSH)** contienen una subunidad α y una subunidad β. La subunidad α de las tres hormonas es casi idéntica y la subunidad α de cualquiera de las tres puede sustituir las otras dos. Por consiguiente, la subunidad α lleva a cabo alguna función común a las tres hormonas en su interacción con el receptor, pero obviamente no es responsable de la especificidad requerida para la unión al receptor afín. Las hormonas no pueden reemplazarse entre sí en la unión a su receptor específico. Por tanto, la especificidad de reconocimiento del receptor está determinada por la subunidad β, cuya estructura es distinta para cada una de las tres hormonas.

En base a estudios topológicos con anticuerpos monoclonales, se ha sugerido una imagen de la interacción de la LH con su receptor, tal como se muestra en la Figura 21.29. En este modelo, el receptor reconoce ambas subunidades del ligando hormonal, pero la subunidad β es reconocida específicamente por el receptor para dar lugar a una respuesta. Con el complejo TSH–receptor puede generarse más de un segundo mensajero. Además de producirse la estimulación de la adenilato ciclasa y el aumento en el nivel intracelular de cAMP, también se activa la ruta del fosfatidilinositol (Figura 21.21). El modelo preferido es aquel en el que existe un único receptor cuya interacción con la hormona activa tanto la adenilato ciclasa como los sistemas fosfolipídicos de segundo mensajero, tal como muestra la Figura 21.30.

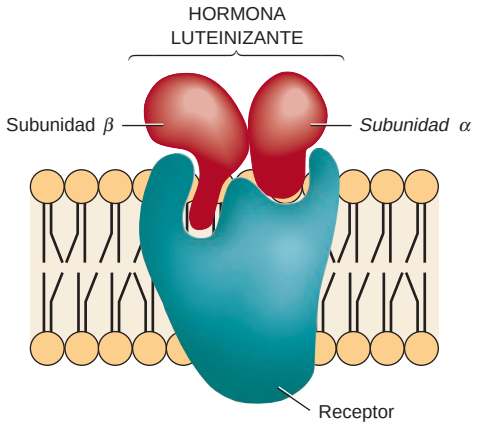


FIGURA 21.29
Interacción de las subunidades α y β de la LH con el receptor de LH de las células de Leydig de rata.
La interacción se determinó mediante análisis topológico con anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos de las subunidades α y β de la hormona. Ambas subunidades participan en la unión al receptor de LH.
Adaptado de Alonoso-Whipple, C., Couet, M. L., Doss, R., Koziarz, J., Ogunro, E. A. y Crowley, W. E. Jr. Endocrinology *123:1854, 1988.*

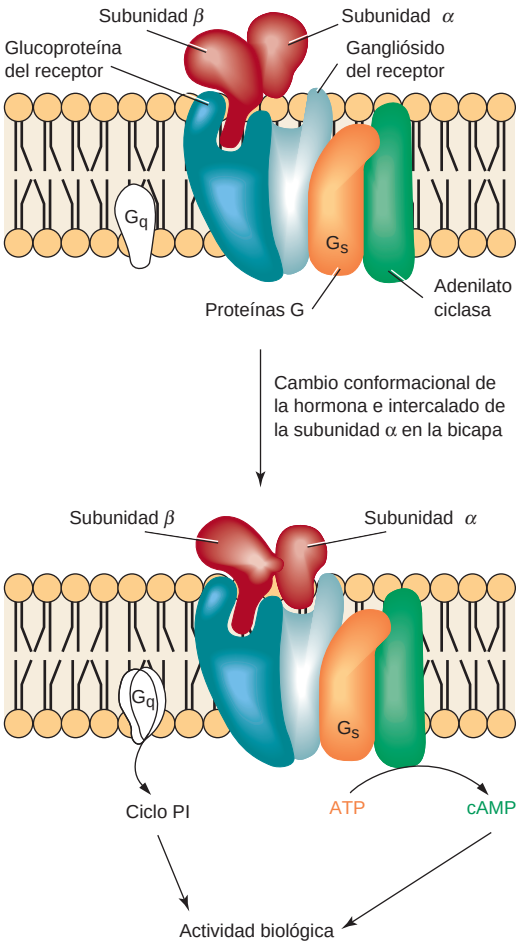


FIGURA 21.30
Modelo del receptor de la TSH.
El receptor se compone de glucoproteína y ganglíósido. Después de que la subunidad β de la TSH interaccione con el receptor, la hormona cambia su conformación y la subunidad α se introduce en la bicapa, donde interacciona con otros componentes de la membrana. La subunidad β de la TSH llevaría los determinantes primarios reconocidos por el componente glucoproteico del receptor. Se sugiere que la señal de la TSH a la adenilato ciclasa es vía el ganglíósido; el componente glucoproteico parece estar más directamente relacionado con el sistema de señal del fosfolípido. PI, fosfatidilinositol; G_s, proteína G unida a la activación de la adenilato ciclasa; G_q, proteína G ligada al ciclo del PI.
Adaptado con modificaciones de Kohn, L. D., et al. In: G. Litwack (Ed.), Biochemical Actions of Hormones, *Vol. 12. New York: Academic Press, 1985, p. 466.*

21.10 | ESTRUCTURA DE RECEPTORES: EL RECEPTOR β-ADRENÉRGICO

Las estructuras de los receptores se analizan adecuadamente en términos de dominios funcionales. Por consiguiente, los receptores de membrana presentarán **dominios de unión del ligando** y **dominios transmembrana**, dominios funcionales que en muchos receptores de membrana llevan implícita actividad proteína quinasa. Además, **dominios inmunológicos** específicos contienen epítopos primarios de regiones antigénicas. Se han clonado y estudiado en relación con su estructura y función varios receptores de membrana, incluidos los receptores β-adrenérgicos (β_1 y β_2) que reconocen catecolaminas, principalmente noradrenalina, y estimulan la adenilato ciclasa. Los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 son subtipos que difieren en la afinidad por la noradrenalina y por antagonistas sintéticos. Así, el receptor β_1-adrenérgico une con mayor afinidad noradrenalina que adrenalina, mientras que el orden de afinidades está invertido en el caso del receptor β_2-adrenérgico. El fármaco isoproterenol presenta mayor afinidad que las dos hormonas por ambos receptores. En la Figura 21.31 se mues-

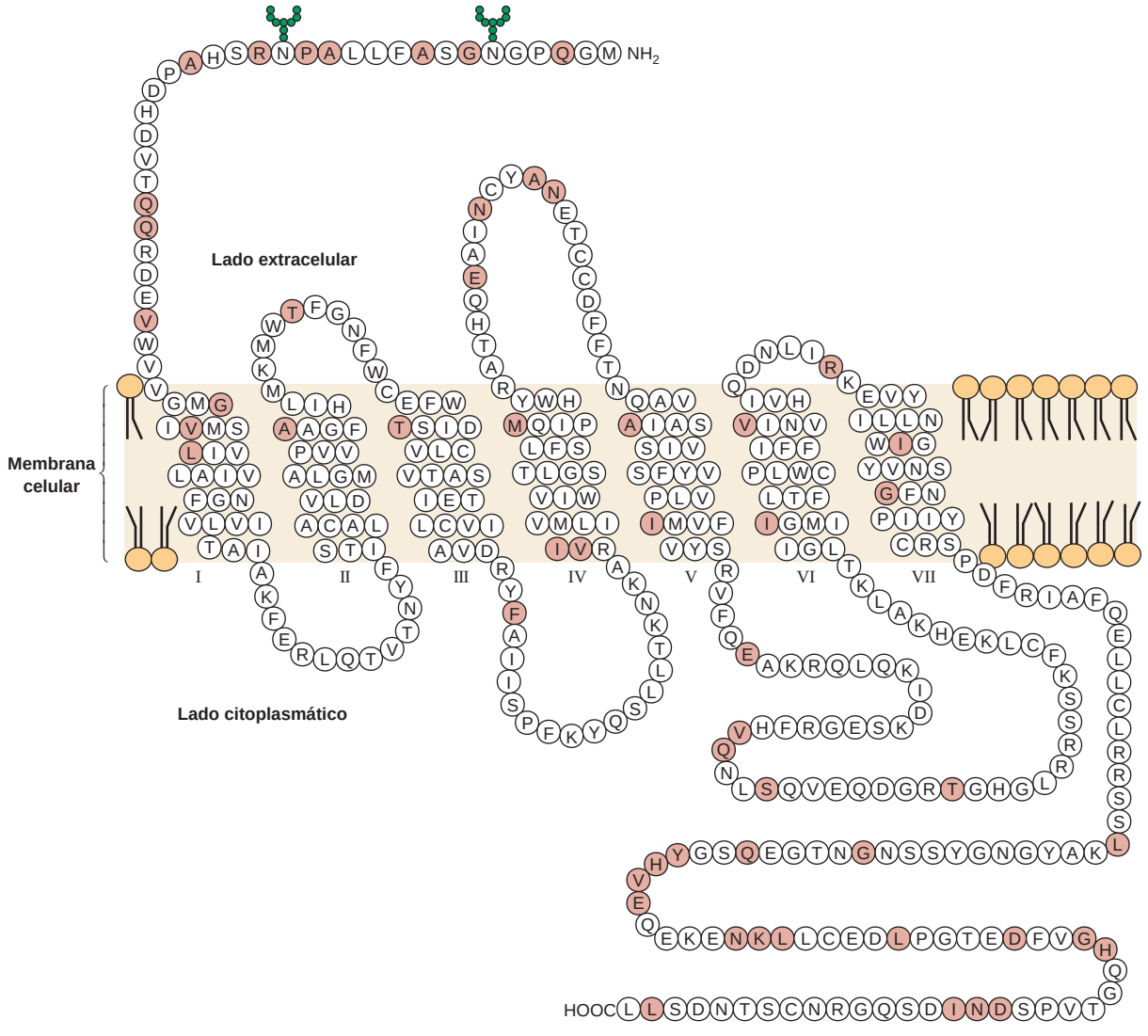


FIGURA 21.31
Modelo hipotético de la inserción del receptor β_2-adrenérgico (AR) en la membrana celular.

El modelo está basado en el análisis de hidropaticidad del β_2-AR humano. Para los aminoácidos se utiliza el código estándar de una letra. Los dominios hidrofóbicos se representan como hélice transmembrana. Los círculos rosas con letras negras indican los residuos de la secuencia humana que son distintos de los de hámster. También se indican los sitios potenciales de N-glucosilación.

Reproducido de Kobilka, B. K., Dixon, R. A., Frielle, T., Doblman, H. G., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *84:46, 1987.*

tra la secuencia de aminoácidos (en código de una sola letra; véase el listado en la Tabla 21.4) del receptor β_2-adrenérgico. Una porción de polipéptido que se extiende desde la hélice α I se prolonga hacia el espacio extracelular. Existen siete dominios que se extienden a través de la membrana que también se encuentran en el receptor β_1 y que presentan extensa homología con el receptor β_2. Las regiones peptídicas citosólicas se prolongan formando lazos entre I y II, III y IV, V y VI y una extensa cadena desde VII. La larga cadena que se extiende desde VII puede contener sitios de fosforilación (residuos de serina y treonina) del receptor, que son importantes para el proceso de regulación del receptor, el cual comporta la desensibilización del mismo. La fosforilación de estos residuos en la cola citoplasmática del receptor da lugar a la unión de una proteína inhibidora denominada β arrestina, la cual bloquea la capacidad del receptor para activar la G_s. Los lazos peptídicos del exterior celular se extienden desde II a III, IV a V y VI a VII, pero el análisis mutacional sugiere que los lazos externos no participan en la unión de ligando. Parece ser que la unión del ligando puede tener lugar en una cavidad formada por los cilindros transmembrana I–VII, la cual en el caso del receptor β_1 tendría la forma que se muestra en visión apical en la Figura 21.32. Recientemente se han presentado trabajos que sugieren que el sexto dominio transmembrana puede desempeñar un papel en la estimulación de la actividad adenilato ciclasa. Por sustitución de un residuo de cisteína específico en el sexto dominio transmembrana, se obtuvo un mutante que presentaba propiedades de unión de ligando normales pero con una capacidad disminuida para estimular la adenilato ciclasa.

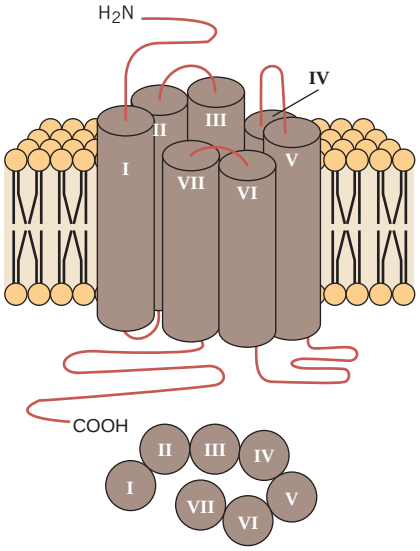


FIGURA 21.32
Disposición hipotética de las hélices del receptor β-adrenérgico en la membrana. La parte inferior de la figura es una visión desde arriba del plano de la membrana plasmática. Se propone que las hélices IV, VI y VII están dispuestas en la membrana de modo que delimitan una cavidad de unión del ligando, con la hélice VII en posición central.
Adaptado de Frielle, T., Daniel, K. W., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *85:9494, 1988.*

21.11 INTERNALIZACIÓN DE RECEPTORES

Hasta ahora hemos descrito sistemas de receptores que transducen señales a través de otras proteínas de membrana, tales como las proteínas G, que se mueven en la membrana celular fluida. No obstante, muchos tipos de complejos hormona–receptor de la membrana celular son internalizados, es decir, transportados desde la membrana celular hacia el interior de la célula mediante un proceso denominado **endocitosis**. Este representa el proceso opuesto a la exocitosis, en la que componentes del interior de la célula son transportados hacia el exterior. El proceso de endocitosis, tal como se presenta en la Figura 21.33, conlleva la unión del complejo polipéptido–receptor en **cavidades recubiertas**, que son invaginaciones de la membrana plasmática en el citosol que acaban separándose de la membrana para formar **vesículas recubiertas**. Las vesículas se liberan de sus cubiertas y se fusionan entre sí, formando vesículas denominadas receptosomas. Los receptores y ligandos del interior de estos **receptosomas** tienen diferentes destinos. Los receptores son reciclados hacia la superficie celular tras la fusión con el aparato de Golgi. Alternativamente, las vesículas se fusionan con lisosomas para la degradación tanto del receptor como de la hormona. Además, algunos complejos hormona–receptor se separan en el lisosoma y sólo se degrada la hormona, mientras que el receptor es devuelto intacto a la membrana. En algunos sistemas, el receptor también puede concentrarse en cavidades recubiertas en ausencia de ligando exógeno y experimentar así un ciclo hacia dentro y fuera de la célula de un modo constitutivo independiente de ligando.

La clatrina forma un entramado estructural para dirigir la internalización de los complejos hormona–receptor desde la membrana plasmática

El componente proteico principal de las vesículas recubiertas es la **clatrina** una proteína no glucosilada de masa molecular 180 000 y cuya secuencia de aminoácidos está muy conservada. La vesícula recubierta contiene un 70% de clatrina, un 5% de polipéptidos de aproximadamente 35 kDa y un 25% de polipéptidos de 50–100 kDa. En la Figura 21.34 se muestran algunas características de la estructura de una vesícula recubierta. Las vesículas recubiertas poseen una estructura de superficie en rejilla que incluye hexágonos y pentágonos. Tres moléculas de clatrina dan lugar a cada vértice del poliedro, y dos moléculas de clatrina contribuyen en la formación de cada arista. La más pequeña de tales estructuras presentaría 12 pentágonos con 4–8 hexágonos y 84 ó 108 moléculas de clatrina. Una vesícula recubierta de 200 nm de diámetro contiene alrededor de 1000 moléculas de clatrina. La clatrina forma estructuras en rejilla flexibles que actúan como armazones para la gemación vesicu-

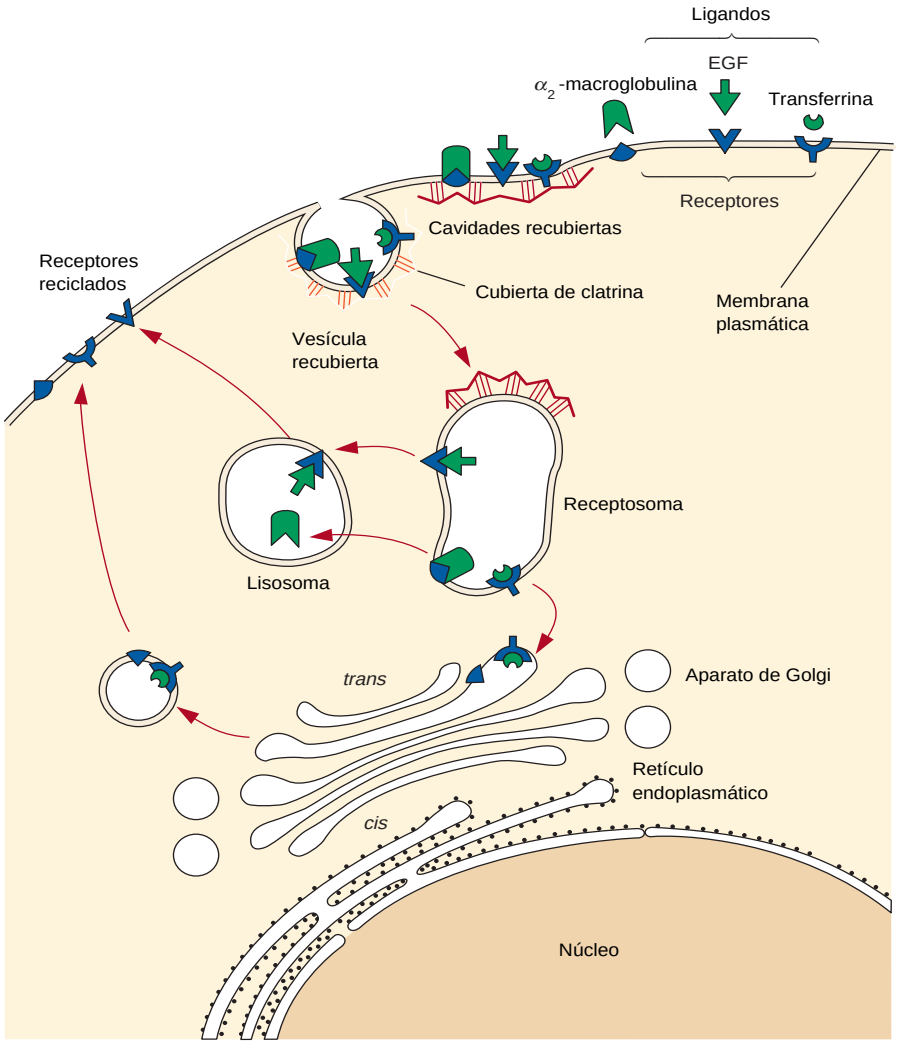
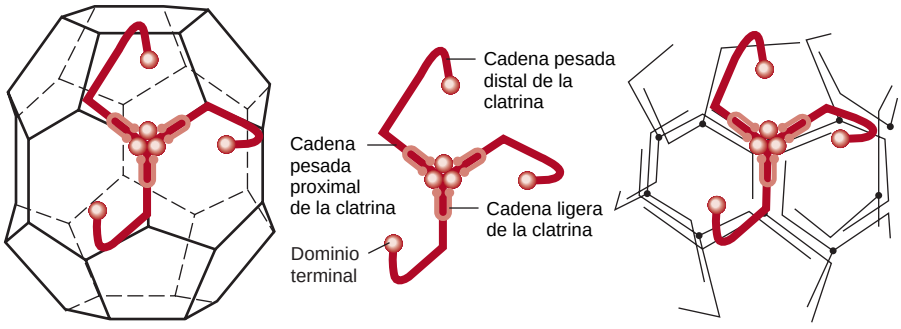


FIGURA 21.33
Esquema que resume la ruta morfológica de endocitosis en las células.
Los elementos morfológicos de la ruta de endocitosis no están dibujados a escala. Los ligandos mostrados como ejemplos son EGF, transferrina y α_2-macroglobulina. EGF se muestra como ejemplo de un sistema de receptor en el cual ligando y receptor son entregados a los lisosomas; la transferrina se muestra como ejemplo de un sistema en el cual ligando y receptor son devueltos a la superficie; la α_2-macroglobulina se muestra como ejemplo de un sistema en el cual el ligando es entregado a lisosomas, pero el receptor es devuelto eficientemente a la superficie celular a través del aparato de Golgi.
Adaptado de Pastan, I. y Willingham, M. C. (Eds.). Endocytosis. *New York: Plenum Press, 1985, p. 3.*

lar. La finalización del proceso de gemación da como resultado que la vesícula madura pueda entrar en el ciclo.

Lo que acontece después de la endocitosis no siempre está claro en relación con un sistema receptor de membrana específico. Este proceso puede ser un mecanismo para introducir receptor o ligando intactos hasta el interior de la célula en algunos casos en los que se cree que el núcleo contiene un receptor o un sitio de unión a ligando. Consideremos, por ejemplo, los factores de crecimiento, de los que se sabe que se unen a un receptor de la membrana celular, pero ponen en marcha mecanismos que dan lugar a la mitosis. La transmisión de señal se puede producir por alteración de una proteína citosólica específica, tal vez por la actividad proteína quinasa asociada al receptor de membrana del factor de crecimiento, que da como resultado la translocación nuclear de la proteína citosólica modificada covalentemente. En el caso de la internalización, el aporte de un ligando intacto (o de parte del ligando) podría interaccionar con un receptor nuclear. Tales mecanismos son especulativos. No obstante, estas ideas podrían constituir el fundamento de la participación de la endocitosis en la transmisión de señal hasta componentes intracelulares.

La **endocitosis** hace a la célula menos sensible a hormona. La eliminación del receptor hacia el interior o el reciclado de componentes de membrana modifica la sensibilidad o el metabolismo (p. ej., en determinadas células los receptores de glucosa van y vienen entre el interior de la célula y la membrana celular bajo control hormonal). En otro tipo de regulación por disminución de receptores (*downregulation*), un complejo hormona–receptor translocado hacia el núcleo reprime el nivel de mRNA del propio receptor mediante la interacción con una secuencia de DNA específica. En el Capítulo 22 se amplía la información acerca de esta forma de regulación por disminución de receptores.



(a) Vesícula recubierta *(b)* Triskelion *(c)* Construcción intermedia

FIGURA 21.34
Estructura y ensamblaje de una vesícula recubierta.
(*a*) Una vesícula recubierta típica contiene una vesícula de membrana de aproximadamente 40 nm de diámetro rodeada por una malla fibrosa de 12 pentágonos y 8 hexágonos. La cubierta fibrosa está formada por 36 "triskelions" de clatrina. Sobre cada uno de los 36 vértices de la cubierta se centra un triskelion de clatrina. Se cree que las vesículas recubiertas que poseen otros tamaños y formas están construidas de forma similar: cada vesícula contiene 12 pentágonos, pero un número variable de hexágonos. (*b*) Detalle de un triskelion de clatrina. Cada una de las tres cadenas pesadas de clatrina se dobla dando un brazo proximal y un brazo distal. A cada cadena pesada de clatrina se une una cadena ligera, muy probablemente cerca del centro. (*c*) Un intermedio en la construcción de una vesícula recubierta, que contiene 10 de los 36 triskelions finales, ilustra el empaquetamiento de los triskelions de clatrina. Cada una de las 54 aristas de una vesícula recubierta está formada por dos brazos proximales y dos brazos distales entrelazados. Los 36 triskelions contienen $36 \times 3 = 108$ brazos proximales y 108 brazos distales, y la vesícula recubierta tiene exactamente 54 aristas.
Véase Crowther, R. A. y Pearse, B. M. F. J. Cell Biol. *91:790, 1981. Reproducido de Nathke, I. S., Heuser, J., Lupas, A., Stock, J., Turck, C. W. y Brodsky, E. M.* Cell *68:899, 1992; y de Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D.* Molecular Cell Biology. *New York: Scientific American Books, 1986, p. 647.*

21.12 ACCIÓN INTRACELULAR: PROTEÍNA QUINASAS

Muchas hormonas derivadas de aminoácidos o polipéptidos se unen a receptores de la membrana celular (excepto la hormona tiroidea) y transmiten sus señales mediante: (1) aumento de cAMP y transmisión a través de la **ruta de la proteína quinasa A**; (2) activación de la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y estimulación de la rutas de **la proteína quinasa C** y del IP_3–Ca^{2+}; o (3) estimulación del nivel intracelular de cGMP y activación de la **ruta de la proteína quinasa G**. Existen además otros sistemas menos frecuentes de transferencia de señal que, por ejemplo, afectan a moléculas de la membrana tales como la fosfatidilcolina. Como se ha comentado anteriormente, en el caso del sistema TSH–receptor es posible que se activen dos de estas rutas.

Se ha descrito el sistema de cAMP que funciona a través de la activación de la proteína quinasa A. Se espera que proteínas específicas sean fosforiladas por esta quinasa y no por otras proteína quinasas, tales como la proteína quinasa C. Tanto la proteína quinasa A como la C fosforilan residuos **serina** o **treonina** de proteínas. Otro sistema de proteína quinasa implica fosforilación de **tirosina**, que tiene lugar en los dominios citoplasmáticos de algunos receptores de membrana y, especialmente, de receptores de factores de crecimiento. Este sistema es importante en el caso del receptor de insulina, del receptor de IGF y de ciertos oncogenes, tal como se verá más adelante. La localización celular de estas proteína quinasas se muestra en la Figura 21.35.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de las proteína quinasas son similares entre sí, lo que sugiere que éstas han evolucionado a partir de una quinasa original común. La tres **quinasas específicas de tirosina** que se muestran en la Figura 21.35 son proteínas receptoras transmembrana que, al activarse por la unión de ligandos extracelulares específicos, fosforilan residuos de tirosina de proteínas (incluso de ellas mismas) en el interior de la célula. Las dos cadenas del receptor de insulina están codificadas por un solo gen, que da lugar a una proteína precursora que se corta en las dos cadenas unidas por puentes disulfuro. Se cree que el dominio ex-

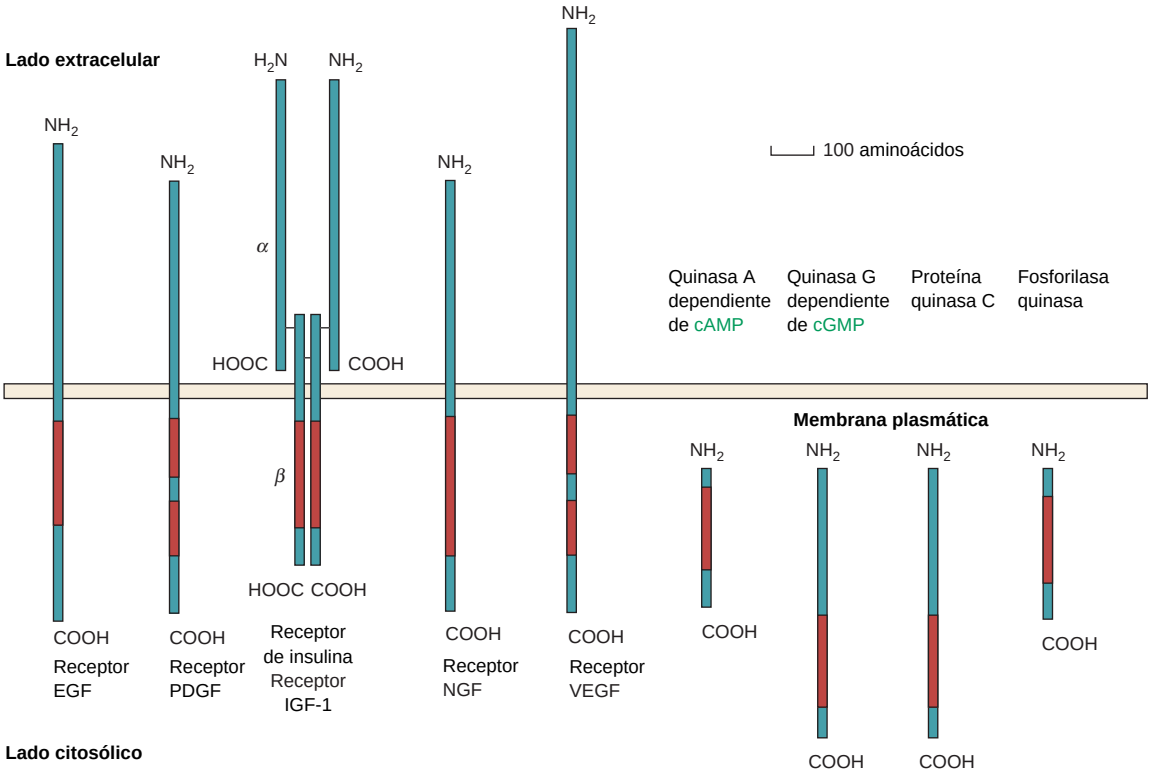


FIGURA 21.35
Tamaño y localización del dominio catalítico de proteína quinasas.
En cada caso, el dominio catalítico (rojo) tiene una longitud de unos 250 residuos de aminoácidos. No se muestran las subunidades reguladoras normalmente asociadas con la quinasa A y la fosforilasa quinasa. EGF, factor de crecimiento epidérmico; NGF, factor de crecimiento nervioso; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular.
Reproducido de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. Molecular Biology of the Cell, *3rd ed. New York: Garland Publishing, 1994, p. 760.*

tracelular del receptor de PDGF está plegado en cinco dominios del tipo inmunoglobulina (Ig), lo que sugiere que esta proteína pertenece a la superfamilia de las Ig.

Las proteínas que están reguladas por fosforilación–desfosforilación presentan múltiples sitios de fosforilación y pueden ser fosforiladas por más de una clase de proteína quinasa.

El receptor de insulina: transducción a través de tirosina quinasa

En la Figura 21.35 puede observarse que las subunidades α del **receptor de insulina** se localizan fuera de la membrana celular y constituyen el sitio de unión de la insulina. Después de la unión a insulina, el complejo receptor experimenta una secuencia de activación que incluye cambios conformacionales y fosforilación (**autofosforilación**) de residuos de tirosina localizados en la porción citoplasmática del receptor (subunidades β). Esta autofosforilación da como resultado la activación de la actividad tirosina quinasa ubicada en la subunidad β, que ahora es capaz de fosforilar proteínas citosólicas, tales como la proteína denominada **sustrato-1 del receptor de insulina** (**IRS-1**), que actúa como proteína de acoplamiento intracelular con las proteínas que median la acción de la insulina. Aunque no está totalmente claro si la fosforilación proteica constituye el mecanismo primario para todas las acciones de la insulina, los resultados netos de estos acontecimientos iniciales de fosforilación incluyen una serie de efectos metabólicos a corto plazo, tales como un rápido aumento en la captación de glucosa, así como también efectos a largo plazo de la insulina en la diferenciación celular y el crecimiento. Aunque, como ya se ha mencionado anteriormente, el propio receptor de la insulina funciona como una **au-**

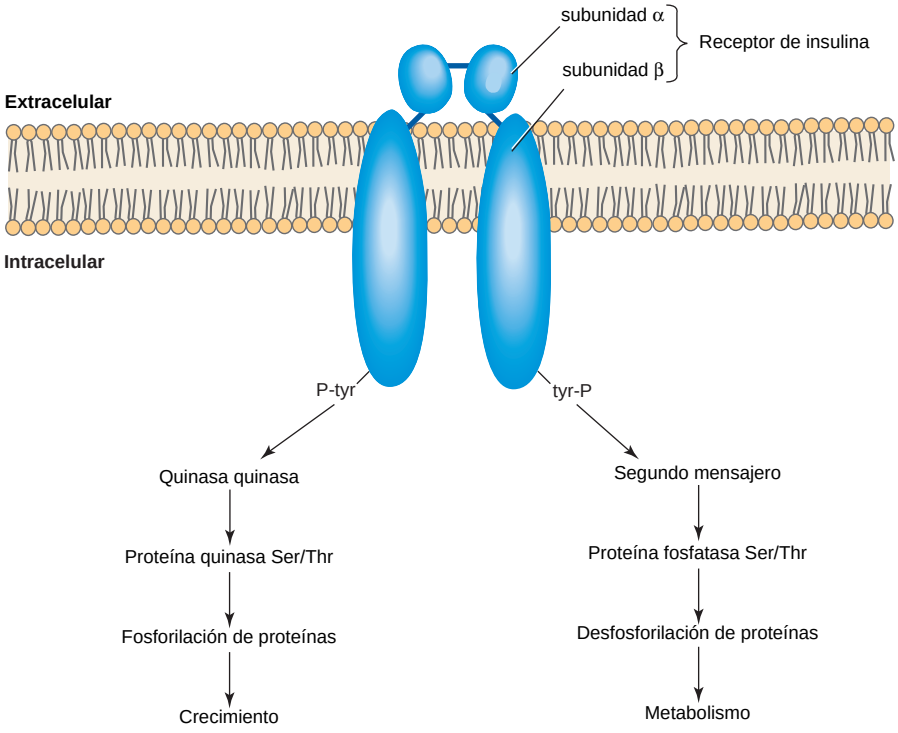
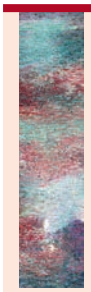


FIGURA 21.36
Esquema hipotético de las dos rutas bioquímicas distintas que explicarían los efectos paradójicos de la insulina en la fosforilación de proteínas.
La insulina produce simultáneamente incrementos en la fosforilación de residuos de serina/treonina de algunas proteínas y disminución en otras. Este efecto paradójico puede resultar de la activación tanto de quinasas como de fosfatasas. El modelo explica (1) la generación de un segundo mensajero soluble que, directa o indirectamente, activa la fosfatasa de serinas y treoninas y (2) la estimulación de una cascada de proteína quinasas, dando lugar a la fosforilación de proteínas celulares.
Reproducido de Saltiel, A. R. FASEB J. *8:1034, 1994.*

totirosina quinasa que se activa por la unión de la hormona, los cambios en la fosforilación proteica que ocurren a continuación se dan predominantemente en residuos de serina y treonina, tal como se indica en la Figura 21.36. Como también se muestra, la insulina estimula simultáneamente la fosforilación de algunas proteínas y la desfosforilación de otras. Ambos sucesos bioquímicos conducen a la activación o la inhibición de enzimas específicos implicados en la mediación de los efectos de la insulina. Estos efectos opuestos (fosforilación y desfosforilación) mediados por la insulina sugieren que estas acciones pleiotrópicas se deban a rutas separadas de transducción de señal originadas a partir del receptor de la insulina. La Figura 21.37 muestra un esquema hipotético de esta bifurcación de señales en la acción de la insulina. Los sustratos de la tirosina quinasa del receptor de insulina constituyen en la actualidad un importante campo de investigación, ya que las proteínas fosforiladas podrían ser las responsables de los efectos de la insulina a largo plazo. Por otra parte, existen pruebas de que un segundo mensajero de la insulina puede desarrollarse en la membrana celular y explicar los efectos metabólicos a corto plazo de la insulina. La sustancia liberada como resultado de la interacción insulina–receptor de insulina puede ser un derivado de glucoinositol que, una vez liberado desde la membrana al interior del citosol, podría ser un estimulador de la fosfoproteína fosfatasa. Esta actividad desfosforilaría diversos enzimas, activándolos o inhibiéndolos, y produciría efectos que se sabe que están asociados con la acción de la insulina. Además, este segundo mensajero, o la actividad directa de fosforilación de la tirosina quinasa del receptor, podrían explicar el movimiento de receptores de glucosa (transportadores) desde el interior de la célula hasta la superficie para dar cuenta del aumento en la utilización de glucosa celular en células que usan este mecanismo para controlar la incorporación de glucosa. Estas posibilidades se revisan en la Figura 21.37. La activación de los enzimas indicados en esta figura da lugar a un incremento en el metabolismo de la glucosa, mientras que la inhibición de los enzimas indicados conlleva una disminución en la utilización de las reservas de glucosa o ácidos grasos (véase Apli. Clín. 21.4).

Actividad de la vasopresina: proteína quinasa A

La actividad de la arginina vasopresina (AVP) sobre la célula distal del riñón constituye un ejemplo de activación de la ruta de la **proteína quinasa A** mediante una hormona. En este caso, la acción de la **vasopresina (VP)**, también denominada hor-



APLICACIÓN CLÍNICA 21.4

Disminución de la actividad quinasa del receptor de la insulina en la diabetes mellitus gestacional

Durante el embarazo, la disminución de la sensibilidad a la insulina constituye una adaptación metabólica maternal importante. Esta adaptación ayuda a proveer la glucosa adecuada para el feto en desarrollo. No obstante, en un 3–5% de las mujeres embarazadas se desarrolla intolerancia a la glucosa. La diabetes mellitus gestacional (DMG) se caracteriza por una disminución adicional de la sensibilidad a la insulina y una incapacidad de compensarla con una secreción aumentada de insulina. Aunque tanto la resistencia a insulina inducida por el embarazo, como la DMG son generalmente reversibles después del embarazo, aproximadamente un 30–50% de mujeres con un historial de DMG desarrollan diabetes tipo 2 más tarde a lo largo de su vida, especialmente si son obesas. Aunque los mecanismos celulares responsables de la resistencia a insulina en la DMG no se conocen bien, la resistencia al transporte de glucosa mediado por insulina parece ser mayor en el músculo esquelético de mujeres con DMG en comparación con mujeres que están embarazadas pero no tienen DMG. Datos recientes indican que defectos en la acción de la insulina, más bien que una disminución de la afinidad de unión del receptor de insulina, contribuirían a la patogénesis de la DMG. Concretamente, las células del músculo esquelético de sujetos con DMG parecen sobreexpresar la glucoproteína-1 de membrana celular plasmática (PC-1), para la cual se ha observado que inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina a través de una interacción directa con las subunidades α y bloqueando el cambio conformacional inducido por insulina. Además, una fosforilación excesiva de residuos serina/treonina localizados en los receptores de insulina del músculo parece disminuir la actividad tirosina quinasa en la DMG. De este modo, una sobreexpresión de PC-1 y una disminución de la actividad quinasa del receptor, junto con una expresión disminuida y fosforilación (residuos de tirosina) del sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1; véase Figura 21.37), podría explicar la resistencia a insulina en la DMG.

Shao, J., Catalono, P. M., Hiroshi, Y., Ruyter, I., Smith, S., Youngren, J. y Friedman, J. E. Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM). *Diabetes* 49(4): 603, 2000; y Maddux, B. A. y Goldfine, I. D. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 49(1): 13, 2000.

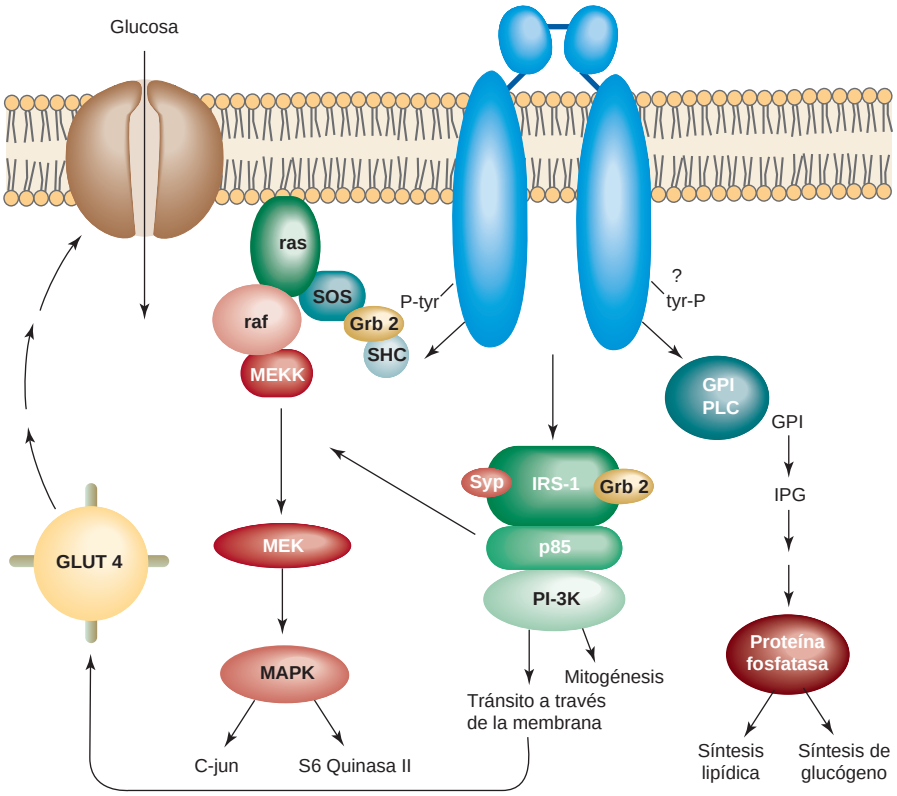


FIGURA 21.37
Esquema hipotético de la transducción de señal en la acción de la insulina. Tras la unión de la hormona, el receptor de la insulina es autofosforilado en las tirosinas y se activa la quinasa. El receptor fosforila sustratos intracelulares, incluidas las proteínas IRS-1 y Shc, las cuales, después de ser fosforiladas, se asocian con proteínas que contienen dominios SH2, como p85, SYP o Grb2. La formación del complejo IRS-1–p85 activa la PI 3-quinasa; el complejo IRS-1/SYP activa la SYP, lo cual conduce a la activación de la MEK. La formación del complejo Shc–Grb2 posibilita la estimulación de la unión de GTP a la $P21^{Ras}$, lo cual desencadena una cascada de fosforilaciones. Estas fosforilaciones probablemente se dan de forma secuencial, y en ellas interviene el protooncogén *raf*, la MEK, la quinasa de MAP y la quinasa II de S6. Es probable que el receptor se acople por separado a la activación de una fosfolipasa C específica que cataliza la hidrólisis de las moléculas de glucosil-PI en la membrana plasmática. El inositol fosfato glucano (IPG), producto de la reacción anterior, puede actuar como segundo mensajero, especialmente en lo que se refiere a la activación de fosfatasas de serina/treonina y la posterior regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos. Abreviaturas: IRS-1, sustrato-1 del receptor de la insulina; SH, homología *src*; quinasa de MAP, quinasa de la proteína activada por mitógenos; MEK, quinasa de la quinasa de MAP; GPI, glucosilfosfatidilinositol; PLC, fosfolipasa; SOS, "son of sevenless".
Reproducido de Saltiel, A. R. FASEB J. *8:1034, 1994.*

mona antidiurética (Tabla 21.5), consiste en provocar un aumento en la reabsorción de agua desde la orina en el riñón distal. En la Figura 21.38 se muestra el funcionamiento de este sistema. Las neuronas que sintetizan AVP (neuronas vasopresinérgicas) reciben una señal para liberar AVP desde sus terminaciones nerviosas mediante impulsos interneuronales que llegan desde un **barorreceptor** que responde a una caída en la presión sanguínea, o desde un **osmorreceptor** (probablemente una interneurona) que responde a un incremento en la concentración salina extracelular. La alta concentración salina extracelular provoca aparentemente una disminución del volumen celular del osmorreceptor y genera una señal eléctrica que se transmite a través del axón del osmorreceptor hasta el cuerpo celular de la neurona VP, generando así un potencial de acción. Esta señal se transmite entonces a través del largo axón desde el cuerpo celular VP hasta su terminación nerviosa, donde, por despolarización, se libera el complejo VP–neurofisina II al espacio extracelular. El complejo entra en capilares locales a través de ventanales y alcanza la circulación general. El complejo se disocia y la VP libre es capaz de unirse a sus receptores de

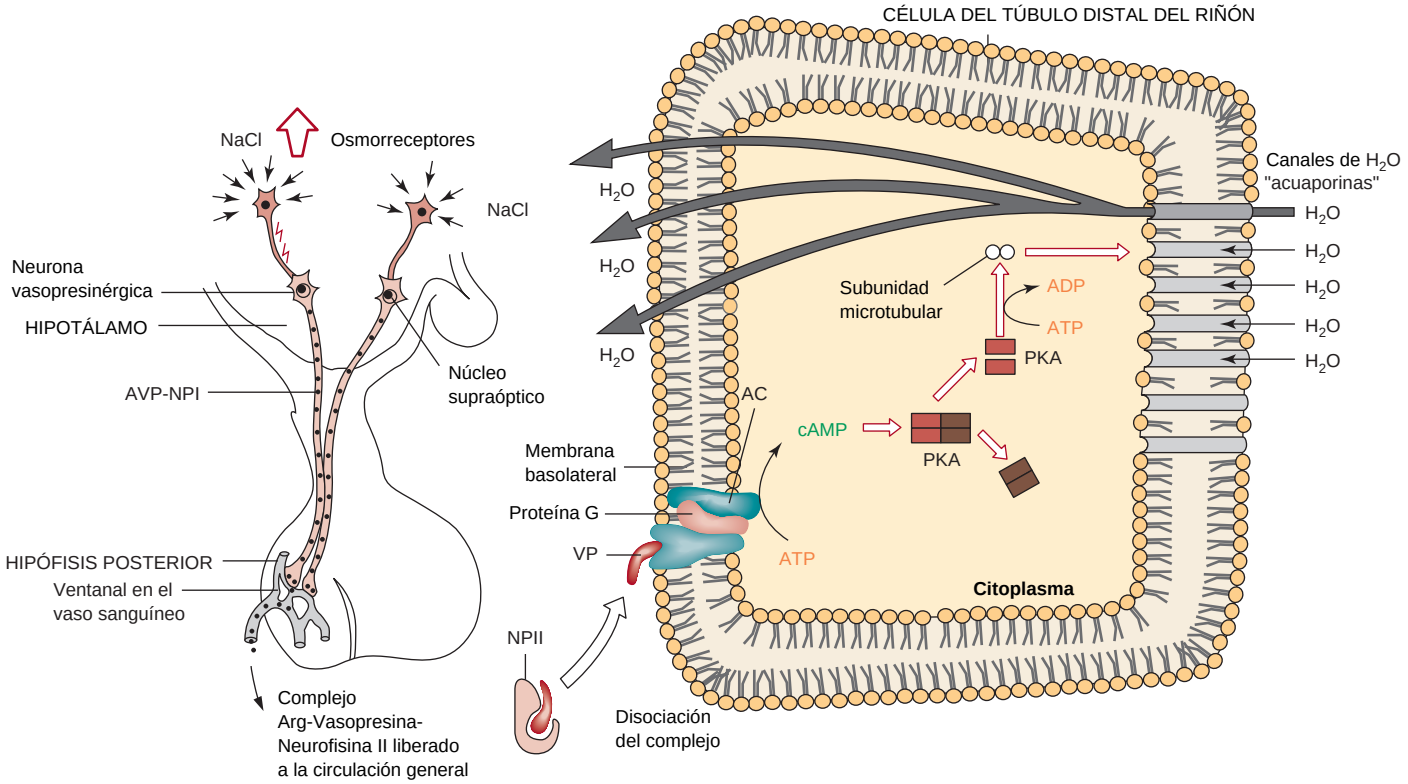


FIGURA 21.38

Secreción y acción de la arginina vasopresina en los túbulos distales del riñón.

La liberación de arginina vasopresina (AVP o VP) desde la hipófisis posterior se inicia con una señal procedente del osmorreceptor, o del barorreceptor (no mostrado), en el ángulo superior derecho de la figura. La señal puede ser un aumento en la concentración extracelular de cloruro sódico, lo cual hace que la neurona del osmorreceptor se contraiga y envíe una señal eléctrica a lo largo de su axón, el cual está en conexión con el cuerpo celular de la neurona vasopresinérgica. La señal se transmite por el largo axón de la neurona vasopresinérgica y despolariza las terminaciones nerviosas, produciendo la liberación, mediante exocitosis, del complejo VP–neurofisina allí almacenado. Estos complejos entran en la circulación local a través de ventanales en los vasos y penetra en la circulación general. Poco después de su liberación, la neurofisina se disocia de la VP, y ésta se une a su receptor específico en la membrana de la célula del túbulo distal del riñón (otros receptores de VP se encuentran en la célula corticotropa de la hipófisis anterior y en los hepatocitos, y sus mecanismos en estas células difieren del mecanismo en la célula del túbulo renal). NPII, neurofisina II; VP, vasopresina; R, receptor; AC, adenilato ciclasa; MF, miofibrilla; GP, glucógeno fosforilasa; Pk_i, proteína quinasa inactiva; PK_a, proteína quinasa activa; R-Ca, complejo subunidad reguladora–AMP cíclico; TJ, "unión cementada"; PD, fosfodiesterasa. El complejo vasopresina–neurofisina se disocia en algún momento, y la VP libre se une a su receptor de membrana en la superficie citoplasmática de la membrana. En la cara citoplasmática de la membrana celular, se activa una adenilato ciclasa mediante una proteína G, lo cual aumenta los niveles de cAMP a partir de ATP. Se estimulan las proteína quinasas dependientes de AMP cíclico que fosforilan varias proteínas (incluidas tal vez las subunidades microtubulares), las cuales, mediante agregación, se insertan en forma de canales de agua (acuaporinas) en la membrana plasmática luminal, incrementando así la reabsorción de agua por difusión libre.

Adaptado en parte de Dousa, T. P. y Valtin, H. Kidney Int. *10:45, 1975.*

membrana específicos en el riñón distal, hipófisis anterior, hepatocito y tal vez otros tipos celulares. Tras la unión al receptor del riñón, la VP provoca la estimulación de la adenilato ciclasa mediante la proteína G estimuladora y activa la proteína quinasa A. La proteína quinasa fosforila subunidades de proteínas que se agregan para formar canales específicos para el agua, denominados acuaporinas (véase Figura 21.38), los cuales se insertan en la membrana luminal y permiten la entrada de volúmenes de agua superiores a los que entrarían por difusión libre. El agua es transportada a través de la célula renal hasta el lado basolateral y a la circulación general, lo que provoca una dilución de la elevada cantidad de sal original (señal) y un aumento en la presión sanguínea. Estas acuaporinas, que son una familia de proteínas integrales de membrana que actúan como canales selectivos de agua, están formadas por seis dominios transmembrana en hélice α. Si bien los monómeros de acuaporina funcionan como canales o poros de agua, su estabilidad y funcionamiento correcto puede requerir su unión en tetrámeros. Las mutaciones específicas en las secuencias de aminoácidos de los lazos intracelulares y extracelulares dan lugar a acuaporinas no

TABLA 21.7 Ejemplos de hormonas que funcionan a través de la ruta de la proteína quinasa A

Hormona	*Localización de la acción*
CRH	Corticotropa de la hipófisis anterior
TSH	Folículo del tiroides
LH	Células Leydig de los testículos Folículo maduro en la ovulación y cuerpo lúteo
FSH	Células de Sertoli del túbulo seminífero, folículo ovárico
ACTH	Capas internas de células de la corteza suprarrenal
Péptidos opiáceos	Algunos funcionan en el SNC en una ruta inhibitoria a través de G_i
AVP	Células tubulares distales del riñón (el receptor de AVP de hepatocito produce recambio de fosfolípidos y captación de iones de calcio; el receptor de AVP de la hipófisis anterior produce recambio de fosfolípidos)
PGI_2 (prostaciclina)	Membrana de las plaquetas sanguíneas
Noradrenalina/adrenalina	Receptor β

funcionales, y al desarrollo de una diabetes insípida, que se caracteriza por un aumento de la sed y la producción de una gran cantidad de orina.

Algunas de las hormonas que funcionan a través de la ruta de la proteína quinasa A se relacionan en la Tabla 21.7.

Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH): proteína quinasa C

La Tabla 21.8 presenta ejemplos de hormonas polipeptídicas que estimulan la ruta del fosfatidilinositol. La acción de la **GnRH**, mostrada en la Figura 21.39, constituye un ejemplo de un sistema que funciona mediante la estimulación de la ruta del fosfatidilinositol y la consiguiente activación del sistema de la **proteína quinasa C**. Probablemente bajo controles interneuronales aminérgicos, se genera una señal para estimular el cuerpo celular de la neurona GnRH-érgica en la que se sintetiza GnRH. La señal se transmite por el largo axón hasta la terminación nerviosa donde está almacenada la hormona. La hormona se libera desde la terminación nerviosa mediante exocitosis, como resultado de la despolarización causada por la transmisión de la señal. La GnRH penetra en el plexo primario del sistema portal cerrado que conecta el hipotálamo y la hipófisis anterior a través de ventanales. A continuación, la GnRH abandona el sistema portal cerrado a través de ventanales en el plexo se-

TABLA 21.8 Ejemplos de hormonas polipeptídicas que estimulan la ruta del fosfatidilinositol

Hormona	*Localización de la acción*
TRH	Tirotropa de la hipófisis anterior que libera TSH
GnRH	Gonadotropa de la hipófisis anterior que libera LH y FSH
AVP	Corticotropa de la hipófisis anterior; ayuda a la CRH en la liberación de ACTH; en el hepatocito produce un aumento del Ca^{2+} celular
TSH	Folículo del tiroides: la liberación de hormonas tiroideas produce un aumento del ciclo del fosfatidilinositol, así como de la ruta de la proteína quinasa A
Angiotensins II/III	Célula de la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal: libera aldosterona
Adrenalina (trombina)	Plaqueta: liberación de ADP/serotonina; hepatocito a través de receptores α: liberación de Ca^{2+} intracelular

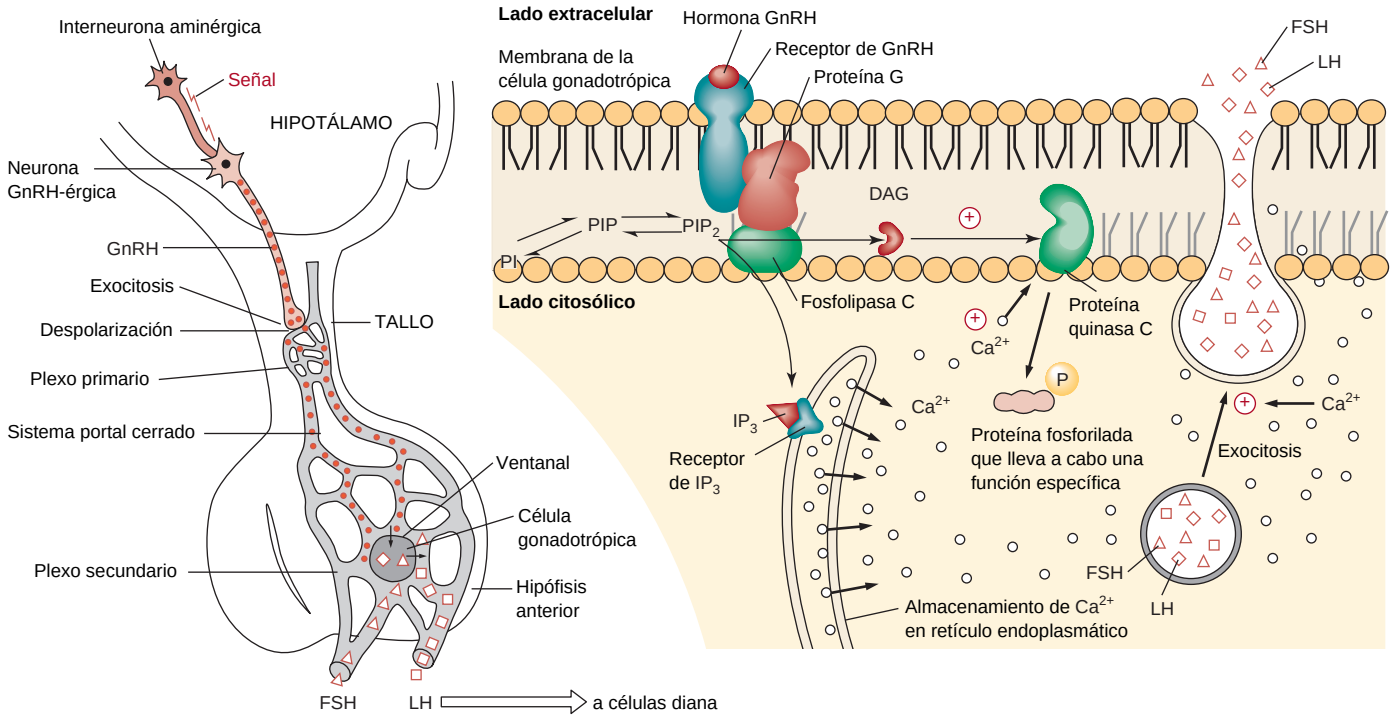


FIGURA 21.39
Regulación de la secreción de LH y FSH.
Se muestra un modo de acción general de la GnRH para la liberación de gonadotropas desde la célula gonadotrópica de la hipófisis anterior. GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; FSH, hormona estimuladora del folículo; LH, hormona luteinizante; DAG, diacilglicerol.

cundario y se une a receptores específicos en la membrana celular de la célula gonadotropa (véase la imagen ampliada en la Figura 21.39). La señal del complejo hormona–receptor se transduce (mediante una proteína G) y se activa la fosfolipasa C. Este enzima cataliza la hidrólisis de PIP_2 para formar DAG e IP_3. El diacilglicerol activa la proteína quinasa C, que fosforila proteínas específicas, algunas de las cuales pueden intervenir en el proceso secretor que da como resultado el transporte de LH y FSH al exterior de la célula. El producto IP_3, que se une a un receptor en la membrana de la partícula de almacenamiento de calcio, localizado probablemente cerca de la membrana celular, estimula la liberación de iones calcio. El elevado Ca^{2+} citosólico provoca un aumento de la estimulación de proteína quinasa C e interviene en la exocitosis de LH y FSH desde la célula.

La proteína quinasa C es una família de quinasas (Figura 21.40). El enzima consta de dos dominios, uno regulador y otro catalítico, que pueden separarse me-

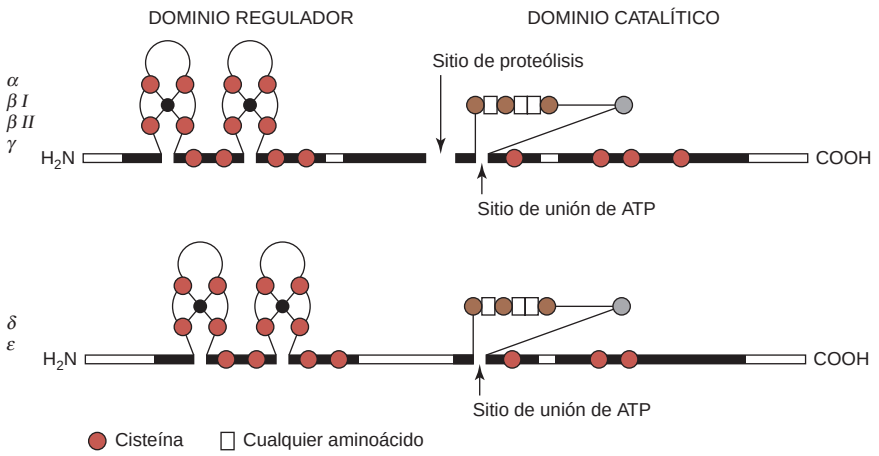


FIGURA 21.40
Estructura común de las subespecies de proteína quinasa C.
Modificado de Kikkawa, U., Kishimoto, A. y Nisbizuka, Y. Annu. Rev. Biochem. *58:31, 1989.*

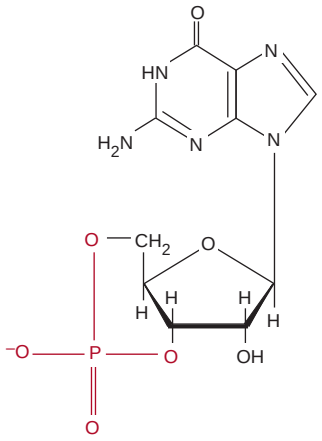


FIGURA 21.41
Estructura del cGMP.

diante proteólisis en un sitio específico. El dominio catalítico libre, denominado anteriormente **proteína quinasa M**, fosforila proteínas en ausencia de los componentes reguladores. La subunidad catalítica libre puede, sin embargo, degradarse. Es necesario conocer más detalles sobre la dinámica de este sistema y la translocación del enzima de un compartimiento a otro. El dominio regulador contiene dos dedos de Zn^{2+} que normalmente se consideran característicos de proteínas que unen DNA (véase p. 388). Todavía no se ha demostrado que la proteína quinasa C tenga esta actividad de unión a DNA, y los dedos de Zn^{2+} podrían intervenir en otros tipos de interacciones. El sitio de unión de ATP en el dominio catalítico contiene la secuencia G: GXGXXG que, con un residuo de lisina más adelante, es una secuencia consenso de unión a ATP.

Actividad del factor atrionatriurético (ANF): proteína quinasa G

El tercer sistema es el **sistema de la proteína quinasa G**, que se estimula por el aumento de cGMP citosólico (Figura 21.41). El **GMP cíclico** es sintetizado por la guanilato ciclasa a partir de GTP. Al igual que la adenilato ciclasa, la guanilato ciclasa está vinculada a un señal biológica específica a través de un receptor de membrana. El dominio extracelular de la guanilato ciclasa puede ejercer la función de receptor hormonal. Éste está directamente acoplado al dominio citosólico mediante un dominio que abarca la membrana (Figura 21.42), que puede aplicarse al **sistema del receptor del factor atrionatriurético** (ANF; también denominado atriopeptina) **guanilato ciclasa**. Así, una sola cadena polipeptídica proporciona el sitio de unión de hormona, el dominio transmembrana y la actividad guanilato ciclasa.

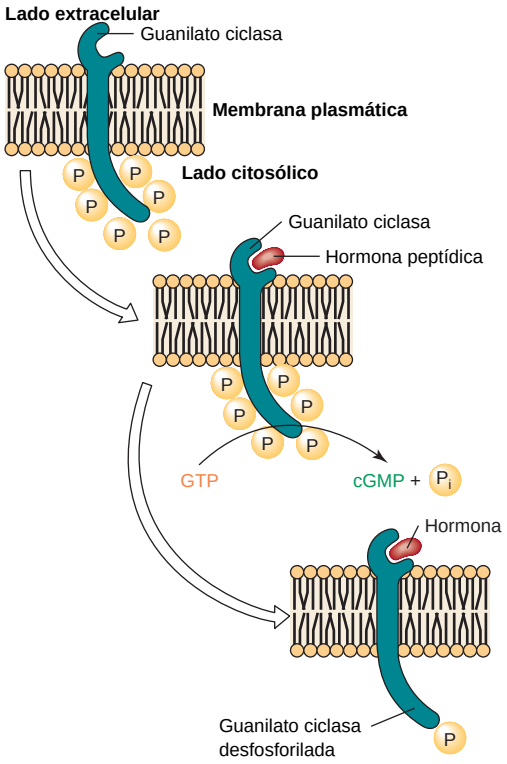


FIGURA 21.42
Modelo de regulación de la actividad guanilato ciclasa tras la unión de una hormona peptídica.
En condiciones normales, el enzima se encuentra en un estado altamente fosforilado. La unión de hormona potencia notablemente la actividad enzimática, la cual va seguida por una rápida desfosforilación de la guanilato ciclasa y un retorno de la actividad a su nivel basal a pesar de la presencia persistente del péptido hormonal.
Reproducido de Schultz, S., Chinkers, M. y Garbers, D. L. FASEB J. *3:2026, 1989.*

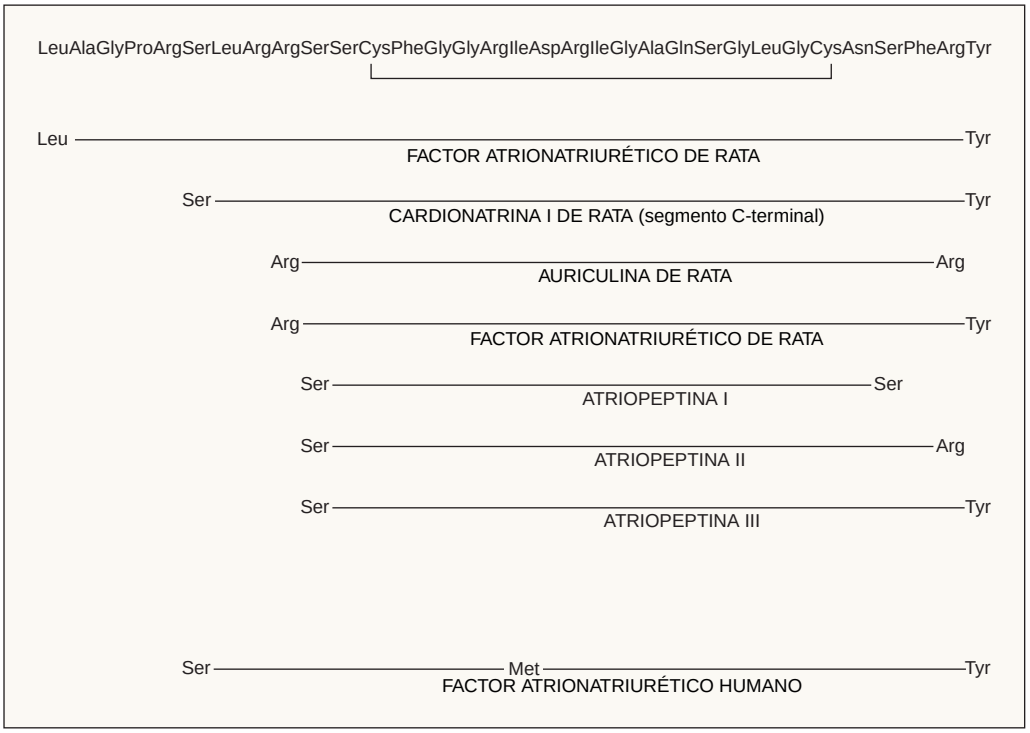


FIGURA 21.43
Péptidos natriuréticos de la aurícula.
Estos péptidos relajan el músculo liso vascular y producen vasodilatación y natriuresis. Otros efectos se tratan en el texto.
Adaptado de Carlin, M. y Genest, J. Endocr. Rev. *6:107, 1985.*

Como se muestra en la Figura 21.43, ANF es un componente de una familia de péptidos; en la parte inferior se presenta una secuencia del ANF humano. Los dominios funcionales del receptor de ANF se ilustran en la Figura 21.44. El factor atrionatriurético se libera de las células cardíacas atriales bajo el control de varias hormonas. Los datos obtenidos de cultivos de células de la aurícula sugieren que la secreción de ANF está estimulada por activadores de la proteína quinasa C cardíaca y disminuida por activadores de la proteína quinasa A. Estas acciones opuestas pueden estar mediadas por la acción de receptores α- y β-adrenérgicos, respectivamente. En la Figura 21.45 se muestra un resumen de la secreción de ANF y sus efectos generales. El ANF se libera mediante diversas señales, tales como expansión del volumen de sangre, presión sanguínea elevada directamente inducida por vasoconstrictores, incorporación elevada de sales y velocidad de bombeo cardíaco elevada. El ANF se secreta en forma de dímero que es inactivo en cuanto a la interacción con el receptor y que en el plasma se convierte en un monómero capaz de interaccionar

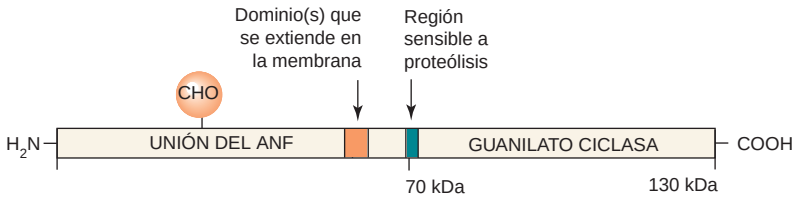


FIGURA 21.44
Dominios funcionales del receptor de ANF-R_1.
El modelo hipotético muestra la secuencia de un dominio de unión de ANF, un dominio(s) que se extiende en la membrana, una región sensible a proteólisis, un dominio catalítico guanilato ciclasa, sitios de glucosilación (CHO) y los extremos amino y carboxilo terminales del receptor.
Reproducido de Liu, B., Meloche, S., McNicoll, N., Lord, C. y DeLéan, A. Biochemistry *28:5599, 1989.*

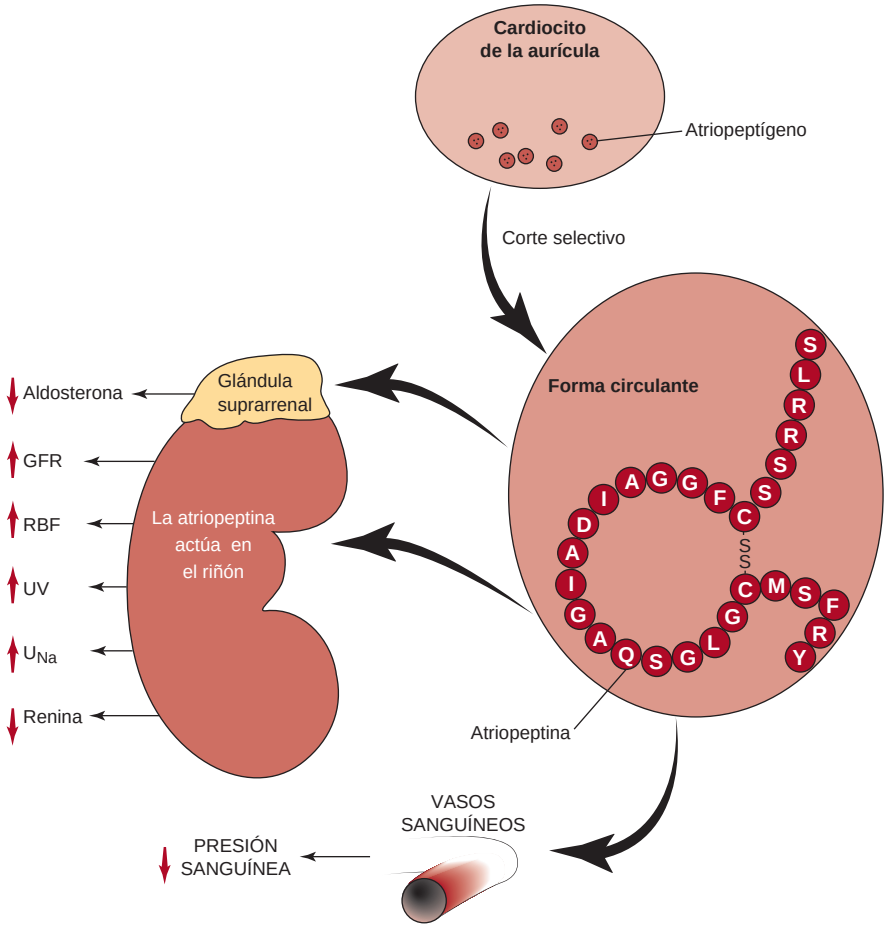


FIGURA 21.45
Esquema del sistema hormonal factor atrionatriurético–atriopeptina de la aurícula. La prohormona se almacena en gránulos situados en los cardiocitos auriculares perinucleares. Un volumen vascular elevado produce el corte y liberación de atriopeptina, que actúa sobre el riñón (glomérulos y papilas) incrementando la velocidad de filtración glomerular (GFR), el flujo de sangre en el riñón (RBF), el volumen de orina (UV) y la excreción de sodio (U_{Na}) y disminuyendo la actividad de la renina en el plasma. La natriuresis y la diuresis también son potenciadas por la supresión de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal y la liberación de arginina vasopresina (AVP) de la hipófisis posterior. La dilatación de los vasos sanguíneos resulta en una disminución de la presión sanguínea (PS). La disminución del volumen vascular proporciona una señal de retroalimentación negativa que suprime los niveles de atriopeptina en circulación.
Reproducido de Needleman, P. y Greenwald, J. E. N. Engl. J. Med. *314:828, 1986.*

con el receptor. Las acciones del ANF (Figura 21.45) consisten en aumentar la velocidad de filtración glomerular, dando así lugar a un incremento del volumen de orina y de la excreción de iones sodio. La secreción de renina también se reduce y disminuye la secreción de aldosterona en la corteza suprarrenal. Esta acción reduce la reabsorción de sodio mediada por aldosterona. El ANF inhibe la vasoconstricción producida por la angiotensina II y relaja la constricción de los vasos renales, de otros lechos vasculares y de las grandes arterias. El ANF funciona a través de su receptor de membrana que parece ser el dominio extracelular de la guanilato ciclasa. El cGMP producido activa la proteína quinasa G, que posteriormente fosforila proteínas celulares para que se expresen muchas de las acciones de esta ruta. Es necesario conocer más datos acerca de la proteína quinasa G. Mediante el uso de análogos del ANF se ha demostrado que la mayoría de receptores expresados en el riñón son "silenciosos" desde el punto de vista biológico, dado que no pueden desencadenar una respuesta fisiológica. Esta nueva clase de receptores puede servir como sitios de unión específicos periféricos de almacenaje y eliminación, y de este modo actuar como tamponador hormonal que module los niveles plasmáticos de ANF.

21.13 | ONCOGENES Y FUNCIONES DE LOS RECEPTORES

Las células normales no malignas contienen secuencias de DNA homólogas a **oncogenes** retrovíricos, denominadas **protooncogenes**. Estos protooncogenes se agrupan según su función o su localización en la célula: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, proteínas nucleares y proteínas de membrana. Las localizaciones subcelulares y las funciones de estas proteínas sugieren que en las células normales juegan un papel importante en términos de crecimiento, desarrollo y diferenciación. Mutaciones, deleciones o inserciones en secuencias protooncogénicas activan estas secuencias dando lugar a oncogenes transformantes. Una célula cancerosa puede

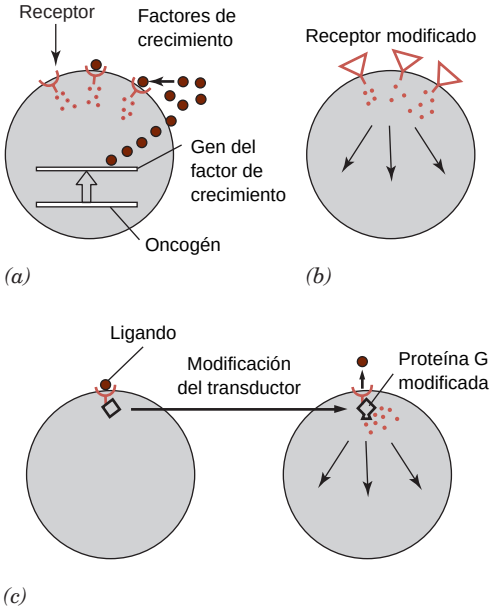


FIGURA 21.46
Mecanismos por los cuales los oncogenes pueden permitir que una célula deje de depender de factores de crecimiento exógenos.
(*a*) Mecanismo autocrino, donde el oncogén citoplasmático estimula indirectamente la expresión del gen del factor de crecimiento y la sobresecreción de factores de crecimiento, los cuales sobreestimulan los receptores sobre la misma célula; (*b*) por modificación del receptor, de modo que éste se encuentra permanentemente "conectado" sin requerir la unión de un factor de crecimiento y (*c*) por modificación de un transductor, caso en el que el intermediario entre el receptor y su actividad resultante, es decir, la proteína estimuladora de GTP, se encuentra permanentemente activado, desacoplando así el requerimiento normal de unión receptor–ligando.

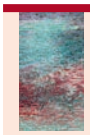
expresar pocos o muchos oncongenes que dictan el comportamiento aberrante e incontrolado de la célula. Existen tres mecanismos por los que los oncongenes permiten que una célula deje de depender de factores de crecimiento exógenos; dichos mecanismos se presentan en la Figura 21.46. Algunos oncogenes son genes de partes de receptores, la mayoría de las veces relacionados con receptores hormonales de factores de crecimiento que funcionan en ausencia del ligando hormonal. De este modo, un oncogén puede representar un gen truncado en el que se ha perdido el dominio de unión de ligando. Esto daría como resultado la producción de la proteína receptora, inserción en la membrana de la célula y función constitutiva continua tanto en ausencia como en presencia de ligando (Figura 21.46*b*, *c*). En esta situación los segundos mensajeros se producirían constitutivamente en gran cantidad en lugar de estar regulados por ligando, y el resultado de ello sería el crecimiento incontrolado de la célula. Algunos oncogenes pueden presentar actividad tirosina quinasa y por consiguiente tener una función similar a la de la tirosina quinasa normalmente relacionada con determinados receptores de la membrana celular. Otros oncogenes están relacionados con receptores de hormonas tiroideas y esteroides (véase p. 974), mientras que otros son proteínas de unión a DNA, algunas de las cuales pueden ser factores de trans-activación, o estar relacionadas con ellos. Las proteínas que se unen a DNA codificadas por los oncogenes pueden ser idénticas a factores de trans-activación o estar relacionadas con ellos. El oncogén *Jun*, por ejemplo, es un componente de la proteína activadora 1 (AP1), un factor de trans-activación que regula la transcripción. El oncogén ***HER-2/neu*** (también conocido como ***c-erbB-2***) codifica un receptor tirosina quinasa transmembrana de 185 kDa que presenta homología con miembros de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF). A diferencia de otros receptores de EGF que transducen la señal del EGF de modo que se facilita la proliferación mediada por hormona de células epiteliales mamarias, *HER-2/neu* presenta actividad tirosina quinasa intrínseca que activa la transducción de señal mediada por receptor en ausencia de ligando. La proteína de *HER-2/neu* se sobreexpresa en un 20–30% de los cánceres de mama humanos. La sobreexpresión de este oncogén tanto en cáncer de mama como de ovario se ha relacionado con un mal pronóstico, que incluye un intervalo sin enfermedad más corto y un tiempo de supervivencia menor; también se ha demostrado que tiene un valor pronóstico y predictivo en el tratamiento con quimioterapia. Se ha demostrado que la sobreexpresión de *HER-2/neu* induce resistencia al **factor de necrosis tumoral** (TNF), la cual cosa hace que las células cancerosas escapen de las defensas inmunitarias del huésped. Datos recientes sugieren que *HER-2/neu* activa constitutivamente la cascada anti-apoptótica **Akt/NF-κB** para conferir esta resistencia al TNF. Se han obtenido anticuerpos monoclonales dirigidos contra *HER-2/neu* que se están usando en la práctica clínica. En la Tabla 21.9 se revisan algunos oncogenes o genes causantes de cánceres, junto con la función de sus protooncogenes (gen normal) (véase Apli. Clín. 21.5).

TABLA 21.9 Oncogenes identificados, sus productos y funciones[a]

Nombre del oncogén	*Retrovirus*	*Tumor*	*Proteína oncogénica*	
			Localización celular	*Función del protooncogén*
src	Sarcoma de pollo	Sarcoma de pollo	Membrana plasmática	Proteína quinasa específica de tirosinas
yes	Sarcoma de pollo		Membrana plasmática (?)	
fgr	Sarcoma de gato		(?)	
abl	Leucemia murina	Leucemia humana	Membrana plasmática	Proteína quinasa específica de tirosinas
fps	Sarcoma de pollo		Citoplasma (¿membrana plasmática?)	
fes	Sarcoma de gato	Sarcoma	Citoplasma (¿citoesqueleto?)	Proteína quinasa específica de tirosinas
ros	Sarcoma de pollo		(?)	
erb-B	Leucemia de pollo	Eritroleucemia, fibrosarcoma	Citoplasma y membranas citoplasmáticas	Dominio de proteína quinasa específica de tirosinas del receptor citoplasmático del EGF
fms	Sarcoma de gato	Sarcoma	Citoplasma y membranas citoplasmáticas	Proteína quinasa específica de tirosinas receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos
mil	Carcinoma de pollo		Citoplasma	(?)
raf	Sarcoma murino	Sarcoma	Citoplasma	Proteína quinasa (serina/treonina) activada por Ras
mos	Sarcoma murino	Leucemia murina	Citoplasma	(?)
sis	Sarcoma de mono	Sarcoma de mono	Secretado	Factor de crecimiento parecido a PDGF, cadena β
Ha-ras	Sarcoma de rata	Carcinoma humano, carcinoma de rata	Membrana plasmática	Proteína de unión a GTP
Ki-ras	Sarcoma de rata	Carcinoma humano, leucemia y sarcoma	Membrana plasmática	Proteína de unión a GTP
N-ras	—	Leucemia humana y carcinoma	Membrana plasmática	
myc	Leucemia de pollo	Linfoma humano	Núcleo	Unión a DNA relacionada con proliferación celular; control de la transcripción
myb	Leucemia de pollo	Leucemia humana	Núcleo	(?)
B-lym	—	Linfoma de pollo, linfoma humano	Núcleo (?)	(?)
ski	Sarcoma de pollo		Núcleo (?)	(?)
rel	Leucemia de pavo	Reticuloendoteliosis	(?)	(?)
erb-A	Leucemia de pollo		(?)	Receptor de la hormona tiroidea (c-erb-Aαl); relacionado con receptores de hormonas esteroides, receptor del ácido retinoico y receptor de la vitamina D_3
ets	Leucemia de pollo		(?)	Unión de DNA
elk (*parecido a ets*)				Proteína de unión a DNA
jun		Osteosarcoma		Los productos se asocian para formar el factor de transcripción del gen AP1
fos		Fibrosarcoma		Los productos se asocian para formar el factor de transcripción del gen AP1

Fuente: Adaptado de Hunter, T. The proteins of oncogenes, *Sci. Am.* 251:70, 1984.

[a] La segunda columna muestra la fuente en la que cada encogén vírico fue aislado por primera vez y el tipo de cáncer inducido por el oncogén. Algunos nombres, como *fps* y *fes* pueden indicar genes equivalentes en aves y mamíferos. La tercera columna es un listado de tumores animales y humanos causados por agentes distintos de los virus, en los que se ha identificado el oncogén *ras* o un protooncogén que no se expresa de forma adecuada.



APLICACIÓN CLÍNICA 21.5
Avances en la quimioterapia del cáncer de mama

El carcinoma de mama es moderadamente sensible a múltiples agentes antitumorales y las combinaciones de fármacos producen velocidades de respuesta más elevadas y más larga duración de respuesta y supervivencia en comparación con la terapia basada en un único agente. A lo largo de la década pasada se han desarrollado varios agentes nuevos que se han mostrado efectivos en el tratamiento del cáncer de mama. Los más destacables son los taxanos (alcaloides de plantas), entre ellos el paclitaxel y el docetaxel. Estos taxanos se están usando actualmente en combinación con otros fármacos activos, como las antraciclinas (doxorrubicina), el cisplatino y sus análogos (carobplatino), agentes alquilantes (ciclofosfamida), antimetabolitos (5-fluorouracilo), alcaloides de la vinca (principalmente el análogo de norvinblastina, vinorelbina) y antiestrógenos (tamoxifeno). Los recientes avances en el conocimiento de la biología básica del carcinoma de mama, que incluyen los estímulos internos y externos que causan transformación maligna, progresión, transformación y metástasis, han aportado nuevas dianas potenciales para la intervención terapéutica. Concretamente, los receptores de factores de crecimiento, como el receptor del EGF (HER-1) y *HER-2/neu* (c-erbB-2) han sido dianas en diversas estrategias de tratamiento. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de estos receptores y el primero en someterse a una completa evaluación preclínica y clínica ha sido el anticuerpo monoclonal anti-HER-2, trasluzumab (Herceptina). Este anticuerpo se une con elevada afinidad al dominio extracelular de HER-2 e inhibe la transmisión de la señal estimuladora del crecimiento. Otras aproximaciones dirigidas a HER-2 incluyen el desarrollo de inhibidores de la tirosina quinasa, además de otros inhibidores de transducción de la señal (vacunas, terapia génica, terapia antisentido). Para el inhibidor de la tirosina quinasa, emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona), se ha demostrado que suprime el crecimiento de células cancerosas de mama que sobreexpresan *HER-2/neu* en ratones desnudos atímicos y que, de hecho, sensibiliza estas células frente a paclitaxel. Se ha demostrado que otro tipo de compuestos, las 4-anilinoquinazolinas, interaccionan selectivamente e inactivan irreversiblemente la tirosina quinasa del receptor del EGF mediante una modificación covalente específica de un residuo de cisteína presente en la bolsa de unión a ATP de esta enzima. Estos nuevos agentes citotóxicos y estrategias antitumorales ofrecen opciones prometedoras de tratamiento para pacientes con carcinoma de mama metastático.

Hortobagyi, G. N. Developments in chemotherapy of breast cancer. *Cancer* 88:3073, 2000; Zhang, L., Lau, Y.-K., Xia, W., Hortobagyi, G. N. y Hung, M.-C. Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* 5:343, 1999; y Fry, D. W., Bridges, A. J., Denny, W. A., Doherty, A., Greis, K. D., Hicks, J. L., Hook, K. E., Keller, P. R., Leopold, W. R., Loo, J. A., McNamara, D. J., Nelson, J. M., Sherwood, V., Smaill, J., Trump-Kallmeyer, S. y Dobrusin, E. M. Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2 by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12022, 1998.

BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, R., Roberts, K. y Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell,* 3rd ed. New York: Garland Publishing, 1994.

Cuatrecasas, P. Hormone receptors, membrane phospholipids, and protein kinases. *The Harvey Lectures Ser.* 80:89, 1986.

DeGroot, L. J. (Ed.). *Endocrinology.* Philadelphia: Saunders, 1995.

Hunter, T. The proteins of oncogenes. *Sci. Am.* 251:70, 1984.

Krieger, D. T. y Hughes, J. C. (Eds.). *Neuroendocrinology.* Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1980.

Litwack, G. (Ed.). *Biochemical Actions of Hormones,* Vols. 1–14. New York: Academic Press, 1973–1987.

Litwack, G. (Ed. in Chief). *Vitamins and Hormones,* Vol. 50. Orlando, FL: Academic Press, 1995.

Norman, A. W. y Litwack, G. *Hormones,* 2nd ed. Orlando, FL: Academic Press, 1997.

Richter, D. Molecular events in expression of vasopressin and oxytocin and their cognate receptors. *Am. J. Physiol.* 255:F207, 1988.

Ryan, R. J., Charlesworth, M. C., McCormick, D. J., Milius, R. P. y Keutmann, H. T. *FASEB J.* 2:2661, 1988.

Saltiel, A. R. The paradoxical regulation of protein phosphorylation in insulin action. *FASEB J.* 8:1034, 1994.

Spiegel, A. M., Shenker, A. y Weinstein, L. S. Receptor–effector coupling by G proteins: implication for normal and abnormal signal-transduction. *Endocr. Rev.* 13:536, 1992.

Struthers, A. D. (Ed.) *Atrial Natriuretic Factor.* Boston: Blackwell Scientific Publications, 1990.

Weinberg, R. A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 230:770, 1985.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. En una cascada hormonal (p. ej., hormonas desde el hipotálamo, hasta la hipófisis y hasta el tejido diana), en cada nivel sucesivo:
   A. es previsible que la cantidad de hormona liberada y su vida media aumenten.
   B. la cantidad de hormona liberada aumenta, pero su vida media no se altera.
   C. la cantidad de hormona liberada y su vida media son aproximadamente constantes.
   D. la cantidad de hormona liberada disminuye, pero su vida media no varía.
   E. es previsible que tanto la cantidad de hormona liberada como su vida media disminuyan.

2. Si un solo gen contiene la información para la síntesis de más de una molécula de hormona:
   A. cualquier tejido que exprese el gen produce todas las hormonas.
   B. todas las moléculas de hormona son idénticas.

C. los sitios de corte en el producto génico son pares de aminoácidos básicos.
D. todos los péptidos del producto génico poseen una actividad biológica bien definida.
E. todas las hormonas poseen una función similar.

3. El efecto directo del cAMP en la ruta de la proteína quinasa A es:
A. activar la adenilato ciclasa.
B. disociar las subunidades reguladoras de la proteína quinasa.
C. fosforilar determinadas proteínas celulares.
D. fosforilar la proteína quinasa A.
E. liberar hormonas de un tejido diana.

4. En las hormonas de las hipófisis anterior, TSH, LH y FSH:
A. todas las subunidades α son diferentes.
B. las subunidades β son reconocidas específicamente por el receptor.
C. la subunidad β por sí sola puede unirse al receptor.
D. la actividad hormonal se expresa mediante la activación de la proteína quinasa B.
E. receptores intracelulares unen estas hormonas.

5. Durante la interacción de una hormona con su receptor, todo lo siguiente es cierto EXCEPTO:
A. puede ser necesaria más de una cadena polipeptídica de la hormona.
B. puede generarse más de un segundo mensajero.
C. un conjunto de hélices transmembrana puede formar el sitio de unión de la hormona.
D. los receptores tienen mayor afinidad por las hormonas que por agonistas o antagonistas sintéticos.
E. las hormonas liberadas de su receptor tras endocitosis podrían interaccionar teóricamente con un receptor del núcleo.

6. Algunos complejos hormona-receptor se internalizan mediante endocitosis. Este proceso puede implicar:
A. unión del complejo hormona-receptor con una cavidad recubierta de clatrina.
B. reciclaje del receptor hacia la superfície celular.
C. degradación del receptor y de la hormona en los lisosomas.
D. formación de un receptosoma.
E. todas las anteriores.

En las siguientes preguntas, correlacionar la hormona numerada con la quinasa que estimula (indicada con letras).

A. proteína quinasa A
B. tirosina quinasa
C. proteína quinasa C
D. proteína quinasa G

7. Factor atrionatriurético.
8. Hormona liberadora de gonadotropina.
9. Insulina.
10. Vasopresina.

Preguntas 11 y 12: el hipopituitarismo puede producirse a causa de traumatismos, como puede ser un accidente automovilístico que cause el corte del tallo que conecta el hipotálamo con la hipófisis anterior, o a causa de tumores en la hipófisis. En el caso de los traumatismos, normalmente ninguna de las hormonas liberadoras del hipotálamo puede llegar a la hipófisis anterior. En el caso de un tumor en la glándula, algunas o todas las hormonas de la hipófisis pueden verse suprimidas. Las hormonas de la hipófisis posterior también pueden perderse. El hipopituitarismo puede ser una amenaza para la vida. La terapia habitual se basa en la administración oral de hormonas del órgano diana final.

11. Si el tallo entre el hipotálamo y la hipófisis anterior se corta, la hipófisis no podría producir la liberación final de todas las hormonas siguientes EXCEPTO:
A. ACTH.
B. estradiol.
C. oxitocina.
D. testosterona.
E. tiroxina.

12. En el hipopituitarismo es necesario mantener el ciclo del ovario en pacientes femeninos. En el ciclo del ovario:
A. la GnRH entra en el sistema vascular por transporte mediante un transportador de membrana específico.
B. el cuerpo lúteo involuciona rápidamente solamente si no se produce fertilización.
C. la inhibina funciona inhibiendo la síntesis de la subunidad α de la FSH.
D. la FSH activa una ruta de la proteína quinasa A.
E. la LH es captada por el cuerpo lúteo y se une a receptores citoplasmáticos.

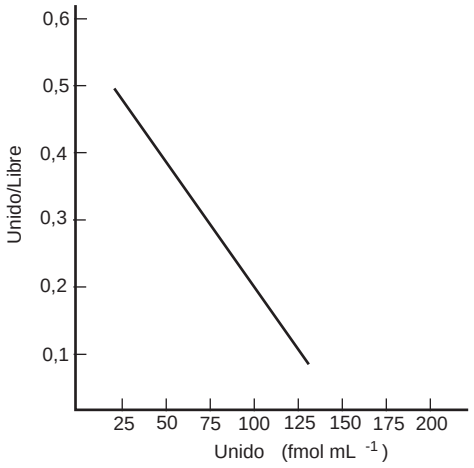
Preguntas 13 y 14: la depresión maníaca puede ser causada por un exceso de actividad de ciertas células del sistema nervioso central, tal vez como resultado de niveles anormalmente elevados de hormonas o neurotransmisores que estimulan el ciclo del fosfatidilinositol (PI). El litio se ha usado durante muchos años para tratar la depresión maníaca. En presencia de Li^+, el ciclo del PI se enlentece a pesar de que haya una estimulación continua y las células se vuelven menos sensibles a estos estímulos. El Li^+ puede tener dos funciones—inhibición de la fosfatasa que desfosforila el inositol trisfosfato e interferencia directa con la función de las proteínas G.

13. El ciclo del PI empieza con la activación de la fosfolipasa C, la cual inicia una secuencia de acontecimientos que incluye todos los siguientes EXCEPTO:
A. activación del IP_3 mediante la acción de una fosfatasa.
B. aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular.
C. liberación de diacilglicerol (DAG) a partir de un fosfolípido.
D. activación de la proteína quinasa C.
E. fosforilación de determinadas proteínas citoplasmáticas.

14. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones acerca de las proteínas G es correcta?
A. las proteínas G se unen a la hormona apropiada en la superfície celular.
B. el GTP está unido a la proteína G en el estado de reposo.
C. la subunidad α puede ser o estimuladora o inhibidora, porque tiene dos formas.
D. la adenilato ciclasa puede activarse únicamente si las subunidades α,β y γ de la proteína G se encuentran asociadas.
E. para que se separen las subunidades de la proteína G es necesario que se hidrolice GTP.

Problemas

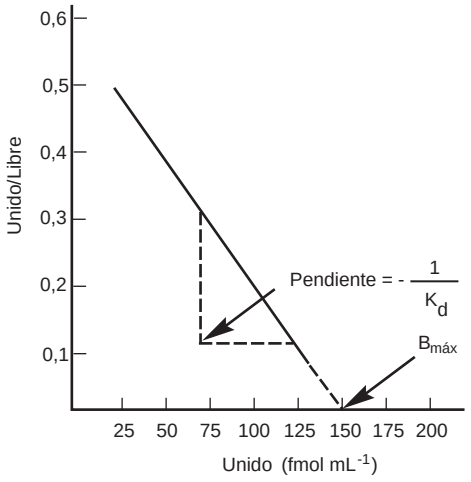
15. Haciendo uso de la representación de Scatchard que se muestra, calcular el número máximo de sitios de unión del receptor con su hormona y la constante de disociación de la unión.



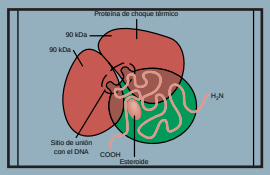
16. ¿Cómo determinaría si una incapacidad de producir cortisol en respuesta a estrés es debida a un problema en el hipotálamo, en la hipófisis anterior o en la corteza suprarrenal?

RESPUESTAS

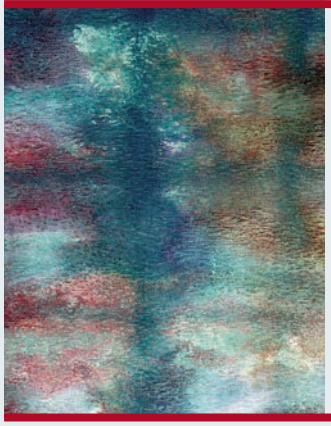
1. **A** Cada paso sucesivo libera típicamente una cantidad mayor de hormona de vida media más larga.
2. **C** Una o más proteasas similares a la tripsina catalizan la reacción. A: El producto del gen POMC se corta de distinto modo en diferentes partes de la hipófisis anterior. B: Pueden encontrarse múltiples copias de una sola hormona, pero no necesariamente. D: Algunos fragmentos no tienen función conocida. E: La ACTH y la β-endorfina, por ejemplo, difícilmente tendrán funciones similares.
3. **B** La unión de cAMP provoca un cambio conformacional en las subunidades reguladoras, lo que da como resultado la liberación de proteína quinasa A activa. A: La adenilato ciclasa produce cAMP. C: Esto es lo que hace la proteína quinasa.
4. **B** Éstas son diferentes en cada hormona. A: Las subunidades α son idénticas o casi idénticas. C: Aunque la especificidad está conferida por las subunidades β, la unión al receptor requiere ambas subunidades. D: Es la proteína quinasa A y quizás también la proteína quinasa C en el caso de la TSH. E: Estas hormonas glucoproteicas grandes no penetran la membrana celular; se unen a receptores en la superficie celular.
5. **D** Los receptores β unen isoproterenol más fuertemente que sus hormonas. A, B: Éstas son ciertas para las hormonas glucoproteicas. C: Esto parece ser cierto para el receptor β_1. E: Esto es posible, pero completamente especulativo; no se conocen ejemplos en la actualidad
6. **E** A y D suceden siempre. B o C ocurren a veces.
7. **D** Éste es activado por cGMP.
8. **C** Esta hormona estimula la fosfolipasa C.
9. **B** La subunidad β del receptor tiene actividad tirosina quinasa. La acción de la insulina es compleja.
10. **A** La vasopresina es sólo una de las muchas hormonas que estimulan la proteína quinasa A.
11. **C** La oxitocina se libera desde la hipófisis posterior. A, B, D y E todas ellas requieren hormonas liberadoras del hipotálamo para que la hipófisis anterior las libere.
12. **D** A: La GnRH entra en el sistema vascular a través de ventanales. B: El cuerpo lúteo es sustituido por la placenta si se produce fertilización. C: Las hormonas glucoproteicas comparten una misma subunidad α. En el control específico de las mismas no intervendrá una subunidad que compartan. E: La LH interacciona con receptores en la membrana celular.
13. **A** El IP_3 es la forma activa. La acción de la fosfatasa sobre él lo hace inactivo al convertirlo en inositol. B: El IP_3 provoca la liberación de calcio. C, D: Éste es el otro segundo mensajero y activa la proteína quinasa C. E: Esto es lo que hace la proteína quinasa C.
14. **C** Qué forma es liberada depende de la hormona y receptor específicos que han interaccionado. A: El receptor se une a la hormona y el complejo interacciona con la proteína G. B, E: el GDP está unido a la enzima en reposo. Su sustitución por GTP provoca la disociación de la subunidad α. De hecho, la hidrólisis del GTP permite que las subunidades se reasocien. D: cuando la subunidad α está disociada de las otras dos interacciona con el enzima bien activándolo, bien inhibiéndolo, dependiendo de si es una α_s o una α_i.
15. A partir de la gráfica de abajo, la intersección con la abscisa es 150 fmol mL^{-1}, que es el número máximo de sitios de unión. La pendiente de la recta es $-0{,}004$, de modo que K_d es 250 fmol mL^{-1}.



16. El órgano final es la corteza suprarrenal. Si el cortisol aumenta en respuesta a una inyección de ACTH, la corteza suprarrenal funciona correctamente. Una infusión intravenosa de CRH (hormona liberadora corticotrópica) debería poder alcanzar la hipófisis anterior. Si la ACTH aumenta en respuesta a esto, la hipófisis funciona, de modo que el problema está probablemente en el hipotálamo. Si la ACTH no aumenta en respuesta a la CRH, la hipófisis anterior no funciona.



22



BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS II: HORMONAS ESTEROIDES

Gerald Litwack y Thomas J. Schmidt

22.1 VISIÓN GENERAL 960

22.2 ESTRUCTURA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES 960

22.3 BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES 963

Las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol 963

22.4 INACTIVACIÓN METABÓLICA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES 967

22.5 COMUNICACIÓN INTRACELULAR Y CONTROL DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES 967

La síntesis de las hormonas esteroides se controla mediante hormonas específicas 967

Aldosterona 967

Estradiol 971

Vitamina D_3 972

22.6 TRANSPORTE DE HORMONAS ESTEROIDES EN LA SANGRE 973

Las hormonas esteroides están unidas a proteínas plasmáticas específicas o a la albúmina 973

22.7 RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES 974

Las hormonas esteroides se unen a proteínas receptoras específicas intracelulares 974

Algunos receptores de esteroides forman parte de la familia c-*Erb*A de protooncogenes o son receptores huérfanos 979

22.8 ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES: REGULACIÓN POSITIVA Y REGULACIÓN NEGATIVA 982

Los receptores de esteroides pueden regularse positiva o negativamente según su exposición a la hormona 983

Receptores hormonales del núcleo y coactivadores y correpresores 983

22.9 EJEMPLOS ESPECÍFICOS DE LA ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES A NIVEL CELULAR: MUERTE PROGRAMADA 985

BIBLIOGRAFÍA 986

PREGUNTAS 986

RESPUESTAS 987

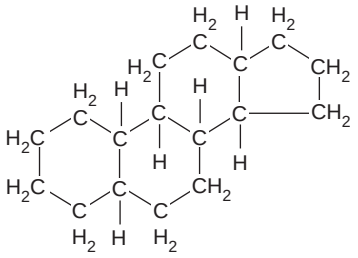
APLICACIONES CLÍNICAS

22.1 Contracepción oral 972

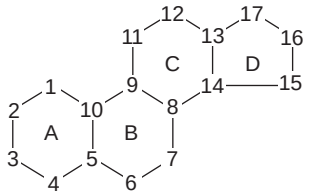
22.2 Síndrome del exceso aparente de mineralocorticoides 977

22.3 La mutación del receptor de mineralocorticoides produce la hipertensión y toxemia del embarazo 984

22.4 Muerte celular programada en el ciclo ovárico 985



Núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno



Sistema de numeración de los carbonos

FIGURA 22.1
El núcleo de los esteroides.

22.1 VISIÓN GENERAL

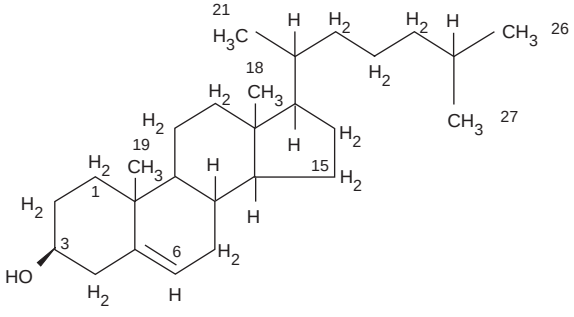
Algunas de las hormonas esteroides humanas son el cortisol, que es el glucocorticoide u hormona antiestrés más destacado, la aldosterona, un regulador importante de la absorción de Na^+, y las hormonas sexuales y progestacionales. Las hormonas sexuales son el 17β-estradiol en la mujer y la testosterona en el hombre. La progesterona es la hormona progestacional más importante. La testosterona se reduce en algunos tejidos diana a dihidrotestosterona, un ligando con mayor afinidad hacia el receptor de andrógenos. La vitamina D_3 se transforma en la hormona secoesteroide correspondiente, la dihidroxi vitamina D_3. Los receptores del ácido retinoico y el receptor de la hormona tiroidea se hallan entre los genes de la familia del supergén receptor de esteroides, a pesar de que los ligandos de estos receptores adicionales no son derivados del colesterol. No obstante, el ácido retinoico y la hormona tiroidea poseen un anillo de seis átomos en su estructura que podrían considerarse similares al anillo A de un esteroide.

A lo largo de este capítulo estudiaremos la estructura de las hormonas esteroides, así como la síntesis y la inactivación de las hormonas esteroides. La regulación de la síntesis de éstas se analiza con respecto al sistema renina–angiotensina para la aldosterona, las gonadotropinas, entre éstas especialmente la hormona estimuladora de los folículos, para el 17β-estradiol, y el mecanismo de la vitamina D_3. Se estudia el transporte de las hormonas esteroides mediante proteínas transportadoras de la sangre. Se presenta un modelo general sobre la acción de las hormonas esteroides a nivel celular, junto con información acerca de la activación del receptor y la regulación de su concentración. Se presentan ejemplos específicos sobre la acción de las hormonas esteroides en la muerte celular programada y en el estrés. Por último, se trata el papel de los receptores de las hormonas esteroides como transactivadores y represores de la transcripción.

22.2 ESTRUCTURA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides proceden de tejidos corporales específicos y se dividen en dos tipos: las **hormonas sexuales** y **progestacionales**, y las **hormonas suprarrenales**. Todas ellas se sintetizan a partir del colesterol y necesitan de un intermediario, la Δ^5-pregnenolona. La estructura de las hormonas esteroides está relacionada con el núcleo del **ciclopentanoperhidrofenantreno**. En la Figura 22.1 se muestra la numeración del sistema anular del ciclopentanoperhidrofenantreno así como las letras con que se designan los anillos. El sistema anular de las hormonas esteroides es estable, y las células de los mamíferos no pueden catabolizarlo. La conversión de hormonas activas en formas menos activas o inactivas implica la alteración de sustituyentes del anillo más que de la estructura anular en sí. El precursor parental de los esteroides es el **colesterol**, que aparece en la Figura 22.2. La biosíntesis del colesterol se estudia en la p. 742.

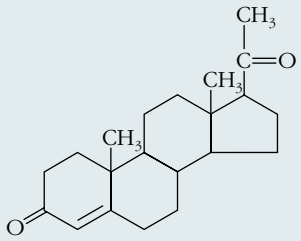
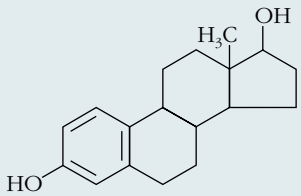
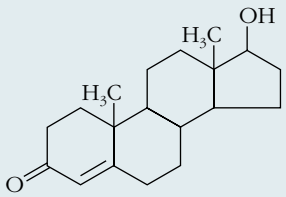
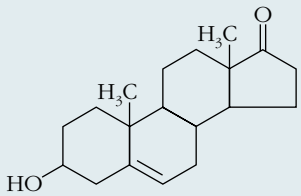
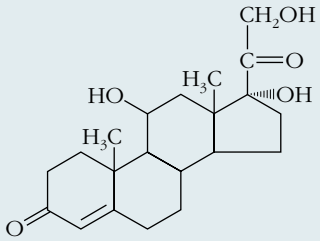
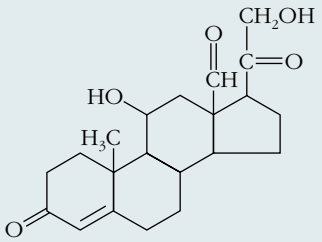
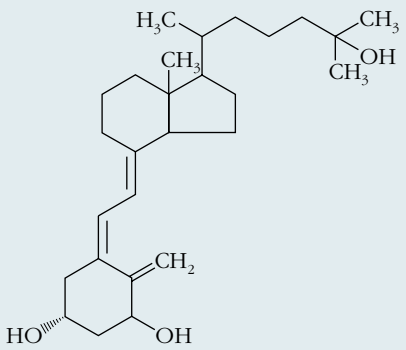
La Tabla 22.1 muestra las principales hormonas esteroides humanas y sus acciones. La mayoría comparten una estructura similar si bien el receptor específico de cada una de ellas es capaz de distinguir el ligando afín. Sin embargo, en el caso del cortisol y de la aldosterona, se produce un solapamiento, ya que cada receptor es-



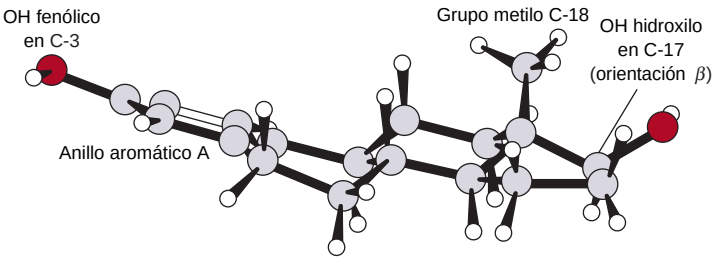
Colesterol

FIGURA 22.2
Estructura del colesterol.

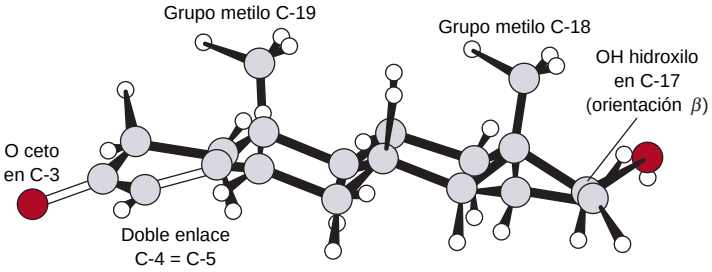
TABLA 22.1 Principales hormonas esteroides humanas

Hormona	*Estructura*	*Secreción de*	*Señal de secreción*	*Funciones*
Progesterona		Cuerpo lúteo	LH	Mantiene (junto con el estradiol) el endometrio uterino para la implantación; factor de diferenciación para las glándulas mamarias
17β-Estradiol		Folículo ovárico; cuerpo lúteo; (células de Sertoli)	FSH	Mujer: regula la secreción de gonadotropinas en el ciclo ovárico (véase Capítulo 21); mantiene (junto con la progesterona) el endometrio uterino; diferenciación de las glándulas mamarias; Hombre: retroinhibidor negativo de la síntesis de testosterona en las células de Leydig
Testosterona		Células de Leydig de los testículos; (glándula suprarrenal); ovarios	LH	Hombre: después de su transformación en dihidrostestosterona, producción de proteínas del esperma en las células de Sertoli; características sexuales secundarias (en algunos tejidos la testosterona es una hormona activa)
Deshidroepiandrosterona		Células reticulares	ACTH	Diversos efectos protectores; andrógeno débil; puede convertirse en estrógeno; todavía no se ha encontrado ningún receptor; inhibe la G6-PDH; regula los coenzimas NAD^+
Cortisol		Células fasciculadas	ACTH	Adaptación al estrés mediante diversas expresiones celulares fenotípicas; ligero aumento del glucógeno hepático; efecto mortífero para ciertos linfocitos T a dosis elevadas; aumenta la presión sanguínea; absorción de sodio en el epitelio luminal
Aldosterona		Células glomerulares de la corteza suprarrenal	Angiotensina II/III	Provoca la absorción de iones sodio a través del canal de conductancia; se produce en grandes cantidades durante la tensión nerviosa; eleva la presión sanguínea; incrementa el volumen de los fluidos
1,25-Dihidroxi vitamina D_3		La vitamina D se produce en las células de la piel por la irradiación solar, y a continuación se producen hidroxilaciones sucesivas en el hígado y en el riñón que conducen a la forma activa de la hormona	PTH (estimula el sistema de hidroxilación del túbulo renal proximal)	Facilita la absorción de Ca^{2+} y fosfato por las células epiteliales del intestino; induce la proteína de unión a calcio intracelular

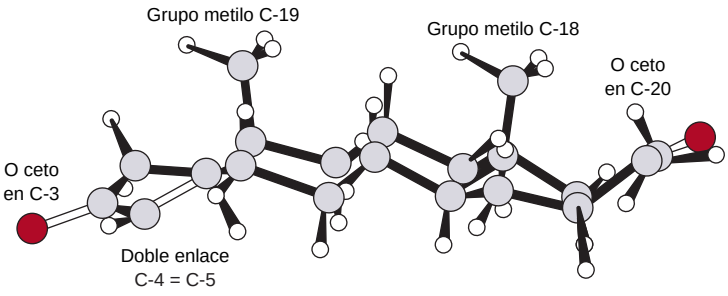
[a] LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimuladora del folículo; ACTH, hormona adrenocorticotrópica; PTH, hormona paratiroidea.



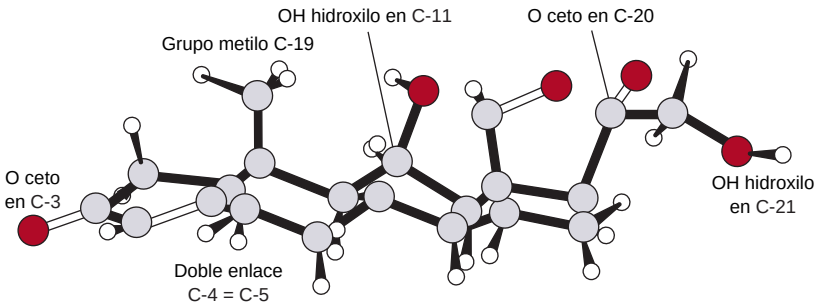
ESTRADIOL



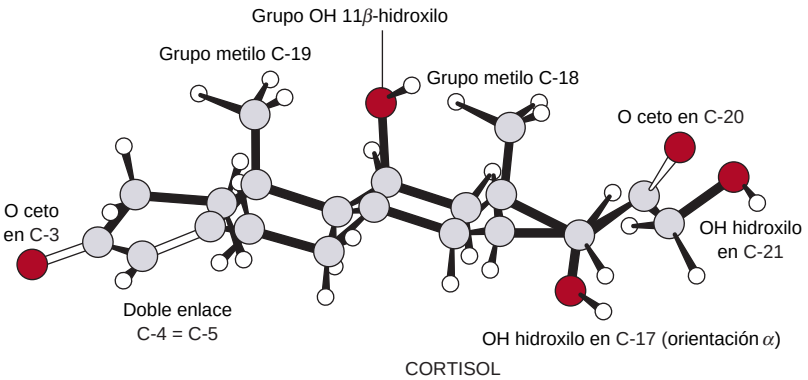
TESTOSTERONA



PROGESTERONA



ALDOSTERONA



CORTISOL

FIGURA 22.3
Representación en "modelo de bolas y varillas" de las estructuras de algunas hormonas esteroides, determinadas mediante métodos de cristalografía de rayos X.
Se indican los detalles de cada estructura. En la aldosterona, el grupo acetal es $R{-}CH(OR_1)(OR_2)$ mientras que el hemiacetal es $R_1C(OR_3)(R_2)(OH)$, donde R_1, R_2 y R_3 son diversos sustituyentes.
Repoducido con permiso de Glusker, J. P. En: G. Litwack (Ed.), Biochemical Actions of Hormones, *Vol. 6. New York: Academic Press, 1979, pp. 121–204.*

pecífico es capaz de unir ambos ligandos. Por lo tanto, la disponibilidad y las concentraciones de cada receptor, así como las cantidades relativas de cada hormona en una célula determinada, son consideraciones de suma importancia. La clasificación de las hormonas esteroides que aparecen en la Tabla 22.1 se ha realizado según el número de carbonos de sus respectivas estructuras. Así el $1,25(OH)_2D_3$ es un secoesteroide C-27; la progesterona, el cortisol y la aldosterona son esteroides C-21; la testosterona y la deshidroepiandroesterona son esteroides C-19; y el **17β-estradiol** es un esteroide C-18. Los diversos tipos pueden distinguirse fácilmente mediante el número de carbonos, como sucede con las hormonas sexuales: los esteroides C-19 son andrógenos, los C-18, estrógenos, y los C-21, esteroides progestacionales o suprarrenales. Además del número de átomos de carbono, también existen algunos sustituyentes del sistema anular característicos. Por ejemplo, los glucocorticoides y los mineralocorticoides tales como la aldosterona poseen en C-11 un grupo OH o una función oxigenada. Existen contadas excepciones en las que algunos compuestos sintéticos sin un grupo OH en C-11 pueden provocar una respuesta, pero para ello éstos necesitan de un nuevo grupo funcional que se halle a corta distancia, en el sistema anular A-B. Los estrógenos no poseen un grupo metilo C-19, y el anillo A presenta tres enlaces dobles. Muchos receptores reconocen principalmente el anillo A del ligando; el receptor del estrógeno puede distinguir el anillo A del estradiol que se extiende fuera del plano de los anillos B-C-D, comparándolo con otros esteroides en los que el anillo A se sitúa en el mismo plano que los anillos B-C-D. Estas relaciones se muestran en la Figura 22.3.

22.3 BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol

La regulación hormonal de la biosíntesis de las hormonas esteroides se realiza mediante elevación de los niveles intracelulares de **cAMP** y **Ca^{2+}**, aunque también podría intervenir la generación de **inositol trisfosfato**, como se muestra en la Figura 22.4. La

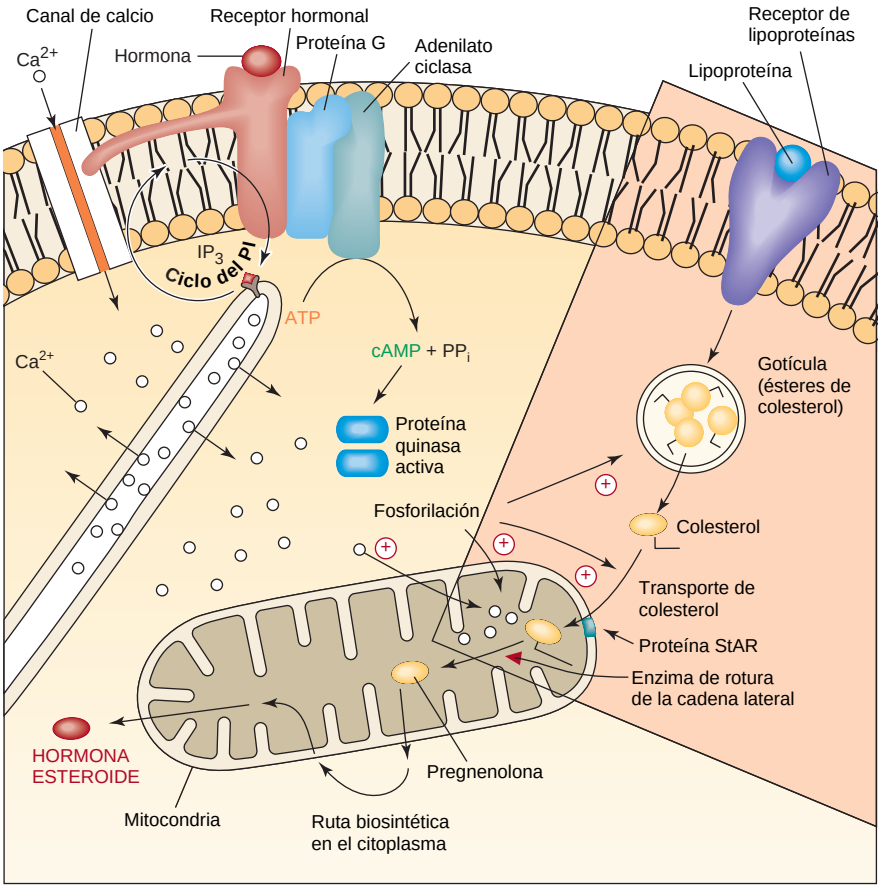


FIGURA 22.4
Visión general de la estimulación hormonal de la biosíntesis de hormonas esteroides. La naturaleza de la hormona (parte superior de la figura) depende del tipo celular y del receptor (ACTH en la síntesis de cortisol; FSH en la síntesis de estradiol; LH en la síntesis de la testosterona, etc., tal y como se indica en la Tabla 22.1). Dicha hormona se une al receptor de la membrana celular y activa la adenilato ciclasa mediante una proteína G estimulante. El receptor, activado por la hormona, puede estimular directamente un canal de calcio o indirectamente, a través de la activación del ciclo del fosfatidilinositol (ciclo PI), tal como se indica en la Figura 21.21. Si el ciclo del PI se estimula al mismo tiempo el IP_3 puede elevar los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} a partir de la reserva de calcio intracelular. El aumento de cAMP activa la proteína quinasa A (Figura 22.18), que al fosforilar diversas proteínas multiplica la hidrólisis de los ésteres de colesterol de las gotículas que pasan a la forma libre e incrementa el transporte de colesterol a las mitocondrias. La combinación de unos niveles elevados de Ca^{2+} y de la fosforilación proteica, así como la inducción de la proteína StAR, induce un aumento de los niveles de rotura de la cadena lateral y la biosíntesis de esteroides. El conjunto de estas reacciones consigue superar los pasos que limitan la velocidad de la biosíntesis de esteroides, con lo que la producción de éstos aumenta. Los esteroides se secretan en el espacio extracelular y circulan por la corriente sanguínea para alcanzar los tejidos diana.

respuesta estimuladora del cAMP se realiza a través de efectos agudos (que tienen lugar en segundos o minutos) y crónicos (que requieren horas) sobre la síntesis de esteroides. El efecto agudo consiste en movilizar y suministrar colesterol, el precursor de todas las hormonas esteroides, a la membrana mitocondrial interna, donde es metabolizado a pregnenolona por el enzima de rotura de la cadena lateral del colesterol del citocromo P450 (véase Capítulo 11 para el estudio de los enzimas P450). En cambio, los efectos crónicos del cAMP se llevan a cabo mediante el aumento de la transcripción de los genes que codifican los enzimas esteroidogénicos y que son por tanto responsables de mantener una producción óptima de esteroides a largo plazo. Aparentemente, se induce una proteína y ésta proteína reguladora recién sintetizada facilita, de hecho, la translocación del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna, donde está localizado el enzima P450. Esta fosfoproteína de 30 kDa se denomina proteína de la **regulación esteroidogénica aguda (StAR)**. Se ha observado que el mRNA de la StAR humana se expresa específicamente en los testículos y ovarios, lugares conocidos de esteroidogénesis. Los pacientes con hiperplasia adrenal congénita lipoide (LCAH), una enfermedad hereditaria en que la esteroidogénesis tanto adrenal como gonadal está significativamente afectada, y en que se producen depósitos lipídicos en estos tejidos, expresan proteínas StAR truncadas y no funcionales. Estos datos genéticos y bioquímicos sugieren de forma clara que la proteína StAR es el factor proteico inducido por hormonas que hace de intermediario en la regulación aguda de la biosíntesis de las hormonas esteroides.

En la Figura 22.5 se muestran las rutas para la conversión del colesterol en las hormonas corticoesteroides suprarrenales. La cadena lateral del colesterol se rompe para formar Δ^5-pregnenolona, lo que libera un aldehído C_6, el isocaproaldehído. La **Δ^5-pregnenolona** es obligatoria para la síntesis de todas las hormonas esteroides. La pregnenolona se convierte directamente en progesterona por la acción de dos enzimas citoplasmáticos, la **3β-ol deshidrogenasa** y la **$\Delta^{4,5}$-isomerasa**. La deshidrogenasa transforma el grupo 3-OH de la pregnenolona en un grupo 3-ceto, y la isomerasa desplaza el doble enlace desde el anillo B hasta el A, produciendo la progesterona. En el cuerpo lúteo, la mayor parte de la síntesis de esteroides se detiene en este punto. Más adelante, la progesterona se convierte en aldosterona o cortisol. En la transformación de la pregnenolona en **aldosterona**, que tiene lugar en las células suprarrenales de la zona glomerulosa, interviene la 21-hidroxilasa del retículo endoplasmático, así como la 11β-hidroxilasa y la 18-hidroxilasa mitocondriales. La producción de cortisol, esencialmente en las células suprarrenales de la zona fasciculada, necesita de la **17-hidroxilasa** y la **21-hidroxilasa** del retículo endoplasmático, junto con la **11β-hidroxilasa** mitocondrial. Las hidroxilasas del retículo endoplasmático (RE) son enzimas citocromo P450 (véase Capítulo 11). La Δ^5-pregnenolona se convierte asimismo en **deshidroepiandroesterona** en las células suprarrenales de la zona reticular mediante la acción de la 17α-hidroxilasa del retículo endoplasmático, para formar 17α-hidroxipregnenolona y a continuación actúa un sistema de rotura de la cadena lateral carbonada, que la convierte en deshidroepiandroesterona. El colesterol se convierte en hormonas sexuales a través de la Δ^5-pregnenolona (Figura 22.6) y de la **progesterona**. Ésta es transformada en testosterona por la acción de enzimas citoplasmáticos y de la 17-deshidrogenasa. La **testosterona** así formada es un producto de secreción muy importante de las células de Leydig, situadas en los testículos, convirtiéndose en dihidrotestosterona en algunas células diana del andrógeno, antes de su unión con el receptor de andrógeno. Esta conversión precisa de la actividad de la **5α-reductasa**, que se encuentra en el retículo endoplasmático y en fracciones nucleares. La pregnenolona puede seguir una ruta alternativa para producir deshidroepiandrosterona, tal como ya se describió anteriormente. Dicho compuesto se transforma en 17β-estradiol a través del sistema del enzima aromatasa y la acción de la 17-reductasa. Asimismo, el estradiol se genera a partir de la testosterona por acción del sistema de la aromatasa.

Las hidroxilasas del retículo endoplasmático que intervienen en la síntesis de las hormonas esteroides son enzimas citocromo P450. Utilizan como sustrato el oxígeno molecular (O_2), uno de cuyos átomos se incorpora al sustrato esteroide (en forma de OH), mientras que el segundo átomo se incorpora a una molécula de agua. Los electrones se obtienen a partir de NADH o NADPH a través de una flavoproteína que los transporta hasta la ferredoxina o a una proteína sin hemo similar. Existen diversos agentes que pueden inducir los niveles de citocromo P450. Obsérvese que durante el proceso de síntesis de esteroides existe movimiento de intermediarios hacia dentro y hacia fuera del compartimiento mitocondrial.

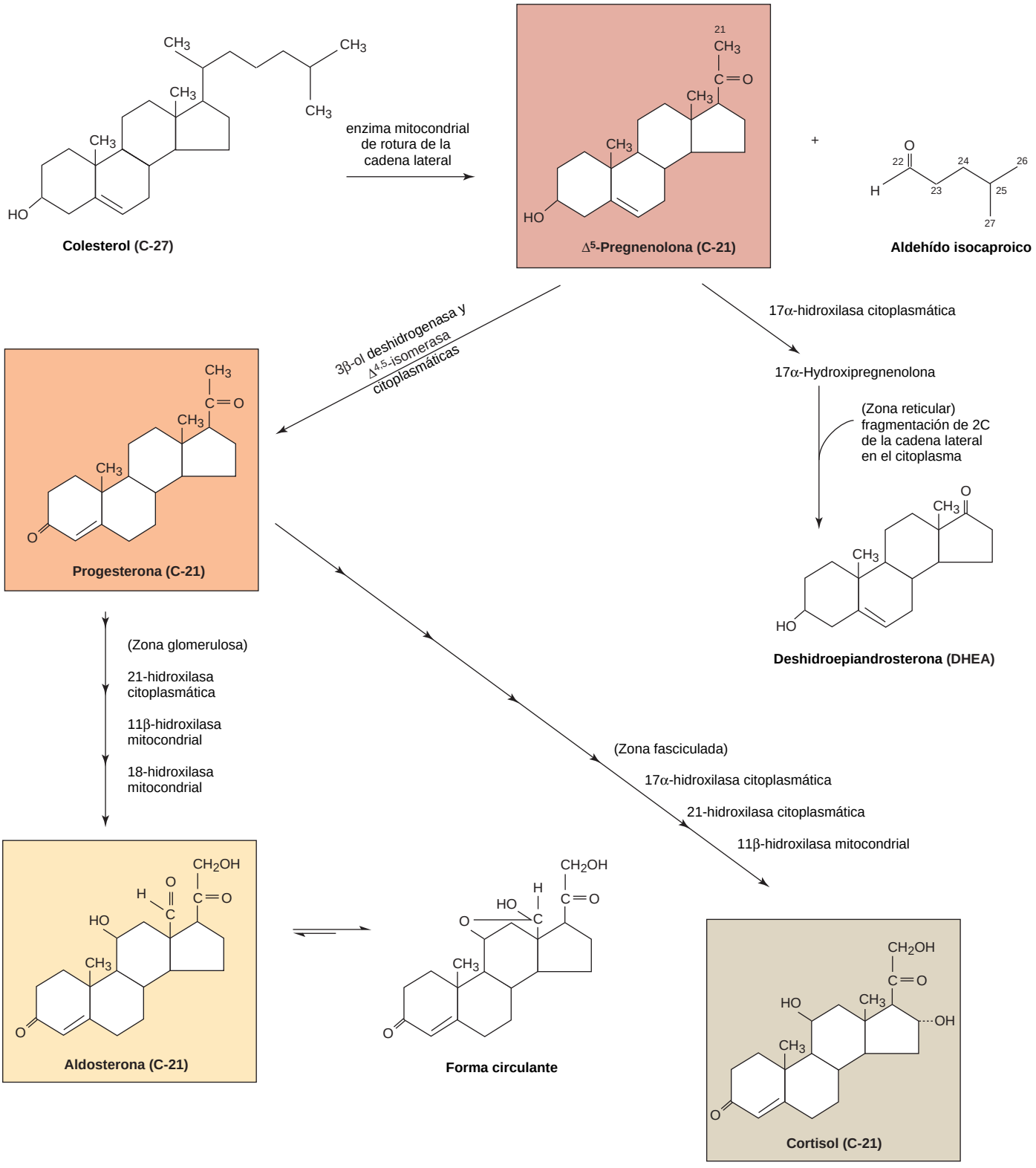


FIGURA 22.5
Conversión del colesterol en hormonas suprarrenales.

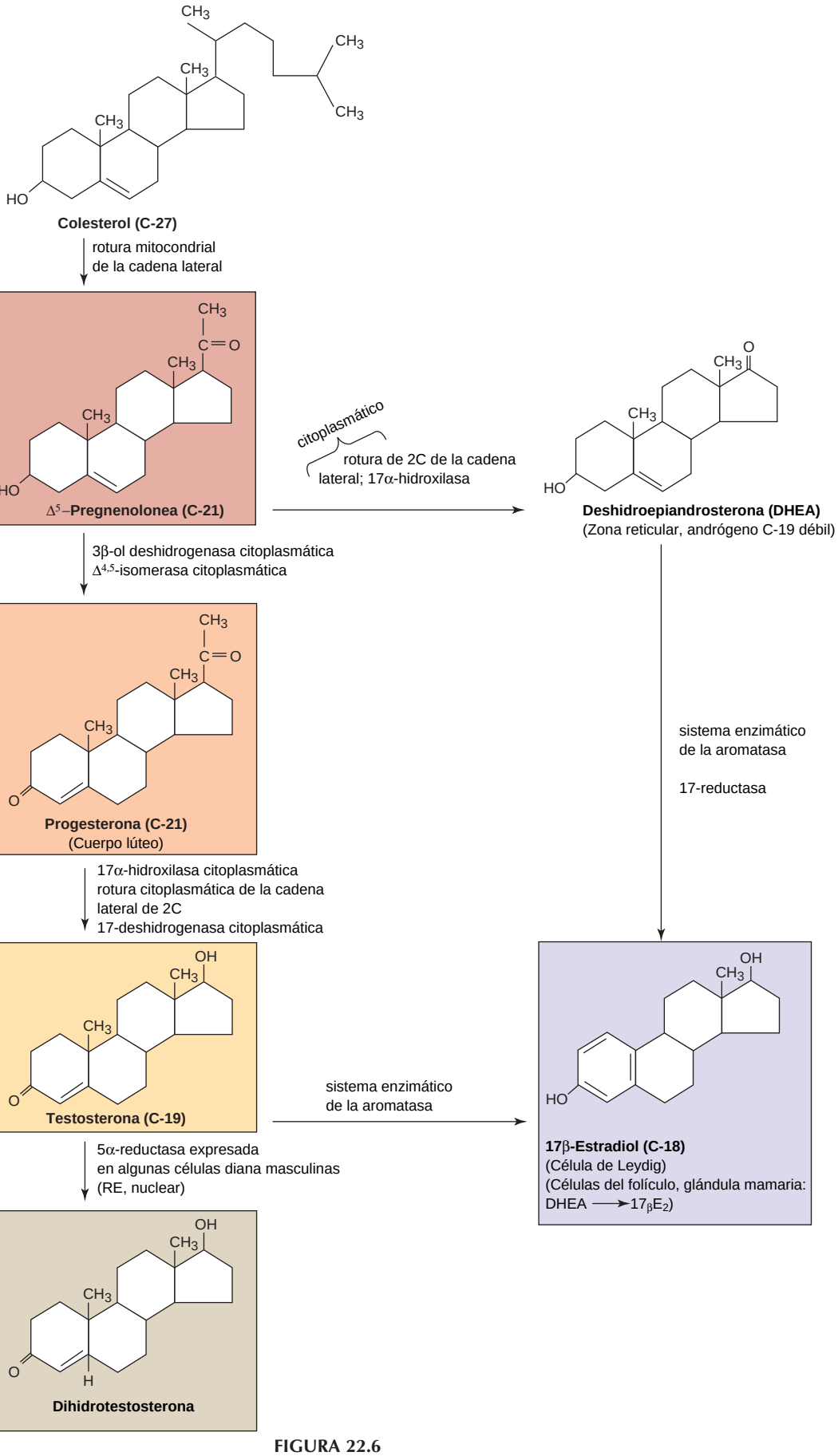


FIGURA 22.6
Conversión del colesterol en hormonas sexuales.

22.4 INACTIVACIÓN METABÓLICA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

El sistema anular de los esteroides es muy estable. En la mayoría de los casos, la inactivación de las hormonas esteroides supone su reducción. Al principio, la testosterona se reduce a una forma más activa mediante el enzima 5α-reductasa para formar **dihidrotestosterona**, el ligando más adecuado para el receptor de andrógeno. Sin embargo, una reducción mayor provoca su inactivación, tal como sucede con las otras hormonas esteroides. Las reacciones de inactivación se producen sobre todo en el hígado, y por lo general convierten en hidrosolubles los esteroides, lo cual viene determinado por su posterior conjugación con glucorónidos o sulfatos que se excretan en la orina. La Tabla 22.2 resume las reacciones que conducen a la inactivación, así como las formas excretorias de las hormonas esteroides.

22.5 COMUNICACIÓN INTRACELULAR Y CONTROL DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

La secreción de hormonas esteroides desde las células que las sintetizan se regula mediante otras hormonas. Muchos de estos sistemas, aunque no todos, se describen en el Capítulo 21, (Figuras 21.2, p. 907 y 21.3, p. 909). Las hormonas que estimulan directamente la biosíntesis y la secreción de las hormonas esteroides aparecen en la Tabla 22.3. Las señales de estimulación de la biosíntesis y la secreción de las hormonas esteroides son hormonas polipeptídicas que actúan a través de receptores específicos de la membrana celular. En algunos sistemas, donde están implicados tanto el cAMP como el ciclo del fosfatidilinositol (PI), no está claro si predomina uno de los dos segundos mensajeros. En muchos casos, como por ejemplo la síntesis y secreción de la aldosterona, es probable que intervengan diversos componentes (p. ej., el receptor muscarínico de la acetilcolina, el receptor de la atriopeptina y sus segundos mensajeros) además de las señales indicadas en la Tabla 22.3.

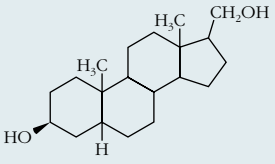
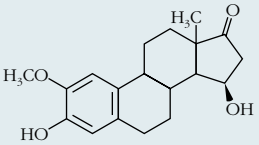
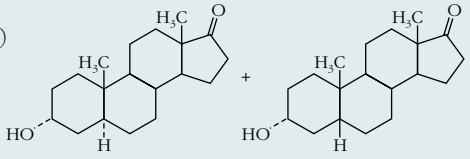
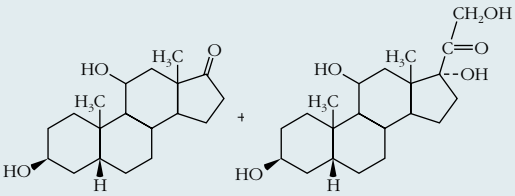
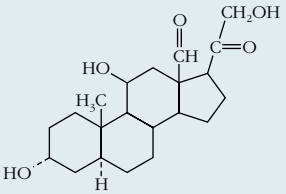
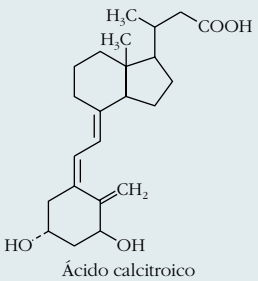
La síntesis de las hormonas esteroides se controla mediante hormonas específicas

En la Figura 22.4 se muestra el mecanismo general para la estimulación hormonal de la síntesis de las hormonas esteroides. La Figura 22.7 representa el sistema para la estimulación de la biosíntesis y liberación de cortisol. El papel del Ca^{2+} en la síntesis y/o secreción de esteroides no está claro. Los pasos limitantes de la velocidad del proceso biosintético son la disponibilidad de colesterol a partir de ésteres de colesterol situados en la gotícula, el transporte de colesterol hacia la membrana mitocondrial interna (proteína StAR), y la activación de la reacción de rotura de la cadena lateral, ya que en caso contrario se convierte en un paso limitante.

Aldosterona

La Figura 22.8 muestra las reacciones que conducen a la secreción de aldosterona en las células de la zona glomerulosa suprarrenal. El control regulador de la síntesis y secreción de la aldosterona es complejo. El impulsor principal es la **angiotensina II**, que se genera a partir de la señalización del **sistema renina–angiotensina**, que se muestra en la Figura 22.9. Básicamente, la señal se produce en unas condiciones que requieren el aumento de la concentración de $[Na^+]$ en la sangre y de la presión sanguínea (volumen sanguíneo). La **renina**, una proteasa, corta el decapéptido N-terminal de la **α_2-globulina (angiotensinógeno)** circulante. Este decapéptido es el precursor hormonalmente inactivo angiotensina I. Éste se transforma en la hormona octapeptídica angiotensina II, por acción del enzima de conversión. La angiotensina II se convierte en el heptapéptido angiotensina III mediante una aminopeptidasa. Tanto la angiotensina II como la III se unen al receptor de la angiotensina (Figura 22.8), que activa el ciclo del fosfatidilinositol generando IP_3 y DAG. El IP_3 estimula la liberación de iones calcio de las vesículas intracelulares de almacenamiento. Además, el complejo angiotensina–receptor estimula la actividad del canal de Ca^{2+}. Los iones K^+ también son necesarios para la estimulación de dicho canal, lo que provoca un gran incremento del nivel de Ca^{2+} citoplasmático. Este incremento de Ca^{2+} citoplasmático interviene en la secreción de aldosterona y, conjuntamente con el dia-

TABLA 22.2 Rutas de excreción de las hormonas esteroides

Tipo de esteroide	*Esteroide inicial*	*Pasos de inactivación*	*Unión de los anillos A:B*	*Representaciones de la estructura esteroide del producto excretado*	*Conjugado más importante*[a]
Progestinas	Progesterona	1. Reducción de C-20 2. Reducción de 4-ene-3-onal	(cis)	 Pregnanodiol (5β-pregnano-3$^{\alpha}$, 2$^{\alpha}$-diol)	G
Estrógenos	Estradiol	1. Oxidación del 17β-OH 2. Hidroxilación en C-2, seguida de una metilación 3. Hidroxilación posterior o formación de cetona en diversas posiciones (p. ej., C-6, C-7, C-14, C-15, C-16, C-18)		 Uno de los diversos compuestos posibles	G
Andrógenos	Testosterona	1. Reducción de 4-ene-3-ona 2. Oxidación del hidroxilo en C-17	(cis y trans)	 Androsterona + Etiocolanolona	G, S
Glucocorticoides	Cortisol	1. Reducción de 4-ene-3-ona 2. Reducción del grupo 20-oxo 3. Rotura de la cadena lateral	(trans)	 11β-OH-androsterona + Alo tetrahidrocortisona	G
Mineralocorticoides	Aldosterona	1. Reducción de 4-ene-3-ona	(trans)	 3α, 11β, 21-(OH)$_3$-20-oxo-5β-pregnano-18-al	G
Metabolitos de la vitamina D	1,25(OH)$_2$D$_3$	1. Rotura de la cadena lateral entre C-23 y C-24		 Ácido calcitroico	?

Fuente: Reproducido a partir de Norman, A. W. y Litwack, G. *Hormones.* Orlando, FL: Academic Press, 1987.

[a]G, Glucurónido; S, sulfato.

TABLA 22.3 Hormonas que estimulan directamente la síntesis y liberación de hormonas esteroides

Hormona esteroide	*Células o estructuras productoras de esteroides*	*Señal*[a]	*Segundo mensajero*	*Sistema de señales*
Cortisol	Zona fasciculada suprarrenal	ACTH	cAMP, ciclo del PI, Ca^{2+}	Cascada hipotalámica–hipofisaria
Aldosterona	Zona glomerulosa suprarrenal	Angiotensina II/III	Ciclo del PI, Ca^{2+}	Sistema renina–angiotensina
Testosterona	Células de Leydig	LH	cAMP	Cascada hipotalámica–hipofisaria
17β-Estradiol	Folículo ovárico	FSH	cAMP	Ciclo hipotalámico–hipofisario–ovárico
Progesterona	Cuerpo lúteo	LH	cAMP	Ciclo hipotalámico–hipofisario–ovárico
$1,25(OH)_2$ D_3	Riñón	PTH	cAMP	Luz solar, glándulas paratiroideas, nivel de Ca^{2+} plasmático

[a]ACTH, hormona adrenocorticotrópica; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del folículo; PI, inositol fosfato; PTH, hormona paratiroidea.

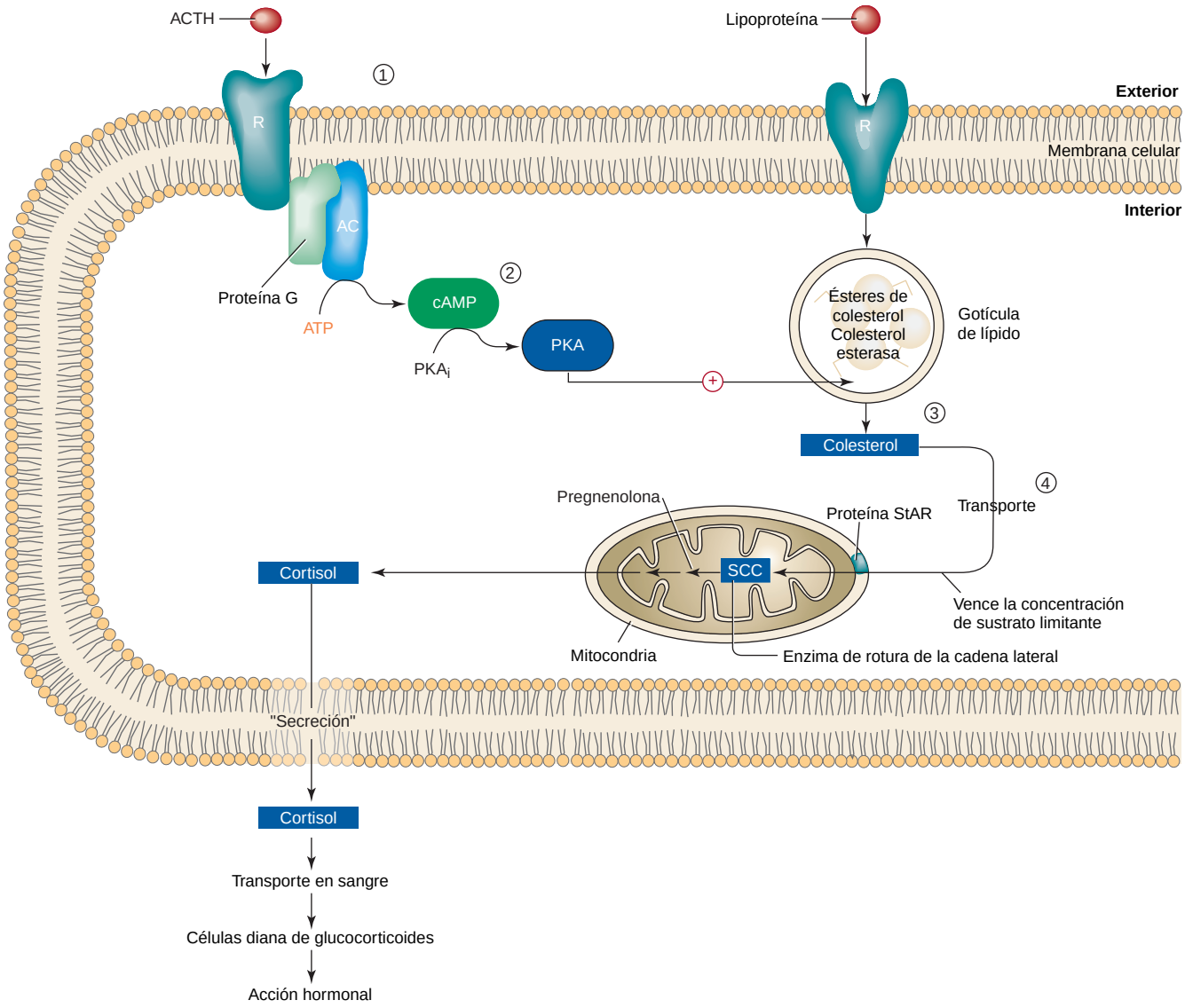


FIGURA 22.7
Acción de la ACTH sobre las células fasciculadas de la glándula suprarrenal para aumentar la producción y liberación de cortisol.
1. Unión de la ACTH al receptor (R) acoplado a la proteína G. 2. Activación de la adenilato ciclasa y generación de cAMP, lo que activa la proteína quinasa A. 3. Hidrólisis de ésteres de colesterol por acción de la colesterol esterasa para generar colesterol. 4. Transporte del colesterol hacia las mitocondrias mediante la proteína de la regulación esteroidogénica aguda. AC, adenilato ciclasa; cAMP, AMP cíclico; PKA, proteína quinasa A; SCC, sistema de enzimas de rotura de la cadena lateral. La proteína StAR (regulador esteroidogénico agudo) es un transportador de colesterol que funciona entre la membrana mitocondrial externa y la interna.

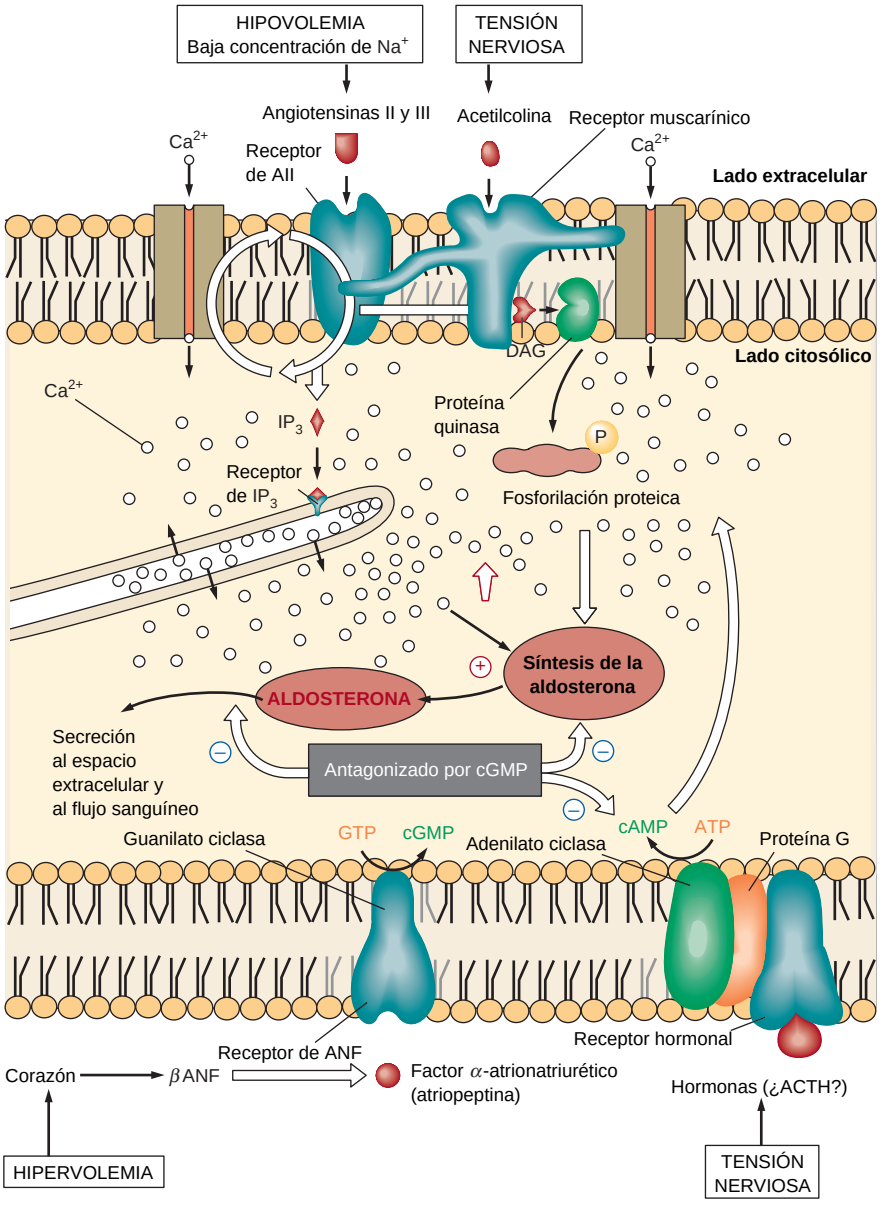


FIGURA 22.8
Reacciones que provocan la secreción de aldosterona en las células suprarrenales de la zona glomerulosa.
cGMP, GMP cíclico; ANF, factor atrionatriurético; véase la Figura 22.7 para el resto de las abreviaturas.

cilglicerol, estimula la proteína quinasa C. La **acetilcolina** liberada a causa de las señales de estrés neuronal posee efectos similares mediados por el receptor muscarínico de la acetilcolina, que refuerzan la captación de Ca^{2+} por parte de la célula y la estimulación de la proteína quinasa C. El incremento en la actividad de la proteína quinasa C produce fosforilaciones de proteínas que estimulan los pasos limitantes de la síntesis de la aldosterona. Ello provoca un aumento en los niveles de aldosterona, que se secreta al espacio extracelular y finalmente a la sangre. Una vez en la sangre, la aldosterona penetra en las células renales distales, se une a su receptor, que inicialmente podría ser citoplasmático y que, en último término, estimula la expresión de proteínas que intensifican el transporte de Na^+ desde el filtrado glomerular hacia la sangre.

Las señales opuestas a las que activan la formación de angiotensina producen el **factor atrionatriurético** (ANF) o atriopeptina de la aurícula del corazón (Figura 22.8; véase también Figura 21.45). El ANF se une a un receptor específico de una membrana celular de la zona glomerulosa y activa la guanilato ciclasa, que forma parte del mismo polipéptido receptor, aumentando por tanto, el nivel citosólico de cGMP. El GMP cíclico es antagonista de la síntesis y secreción de la aldosterona, al igual que de la formación de cAMP por la adenilato ciclasa.

La aldosterona debería considerarse como una hormona de estrés, ya que su presencia en elevados niveles en la sangre es fruto de situaciones tensas. Por el con-

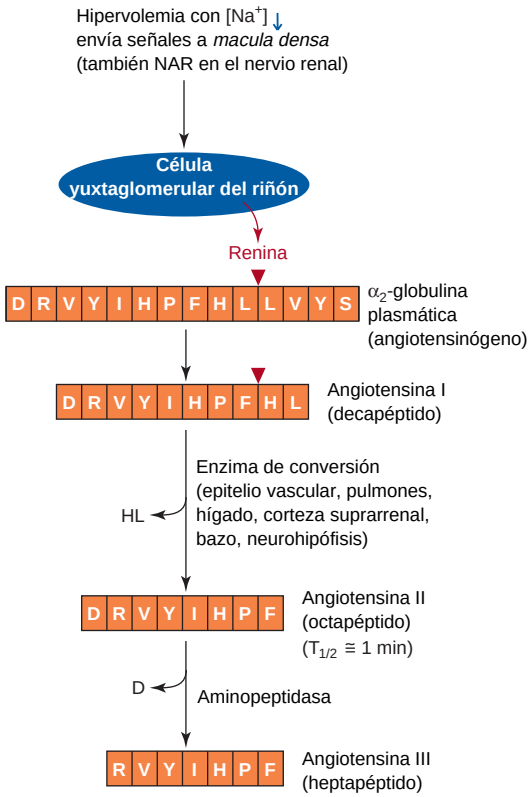
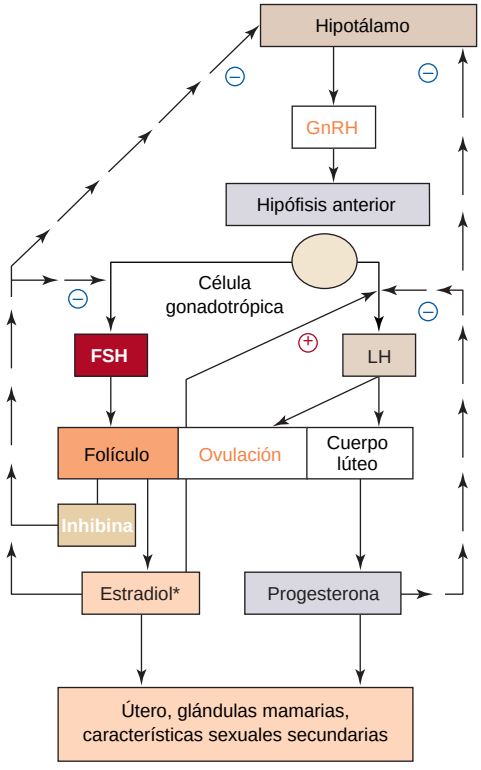


FIGURA 22.9
El sistema renina–angiotensina.
Las abreviaturas de los aminoácidos se encuentran en la p. 97. NAR, noradrenalina.

trario, el cortisol, que también se libera bajo estrés, presenta además una liberación biorrítmica (probablemente bajo el control de la serotonina y la vasopresina), provocando una considerable reabsorción de Na^+, quizá a través de la estimulación por glucocorticoides del sistema de compuerta antiparalela Na^+/H^+ en las células luminales del epitelio. Esta es tan sólo una muestra de las múltiples actividades del cortisol (entre ellas, por ejemplo, la acción antiinflamatoria, el control de los factores de crecimiento de las células T, o la síntesis de glucógeno y sus efectos sobre el metabolismo de los glúcidos).

Estradiol

En la Figura 22.10 se muestran los controles que se ejercen sobre la formación y la secreción de la hormona sexual femenina **17β-estradiol**. Durante el desarrollo surgen centros de control en el sistema nervioso central: uno de actividad constante y otro cíclico. Sus funciones son necesarias para iniciar el ciclo ovárico en la pubertad. Dichos centros deben armonizarse con el disparo de otras neuronas, tales como las que generan un mecanismo de reloj biológico mediante la liberación de catecolaminas u otras aminas para iniciar la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), probablemente en intervalos de una hora. En la p. 933 se explican estas reacciones con mayor detalle. La FSH circula y se une a su receptor específico de la membrana celular de las células del folículo ovárico y a través de sus segundos mensajeros, básicamente el cAMP y la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP, se produce la estimulación de la síntesis y secreción de la hormona sexual femenina, el 17β-estradiol. Cuando se alcanzan los niveles normales de estimulación de 17β-estradiol, se produce una retroinhibición en la **gonadotropa** (hipófisis anterior), lo que detiene la secreción de FSH. No obstante, hacia la mitad del ciclo ovárico, los niveles de 17β-estradiol experimentan una superelevación, lo que tiene efectos positivos y no negativos sobre la gonadotropa. Esto desencadena la liberación de grandes cantidades de LH, lo que recibe el nombre de punta de LH, y de elevados niveles de FSH. Las cantidades de ésta última son sensiblemente inferiores a las de la primera porque el folículo produce **inhibina**, una hormona polipeptídica que inhibe específicamente la liberación de FSH sin afectar a la liberación de LH. El aumento de LH durante la punta de LH participa en el proceso de ovulación. Después de ésta, los restos del folículo se diferencian en el cuerpo lúteo funcional, que



*Justo antes de la ovulación, el nivel de estradiol es elevado y estimula (control positivo) en vez de inhibir los gonadotropos.

FIGURE 22.10
Formación y secreción del 17β-estradiol y de la progesterona.

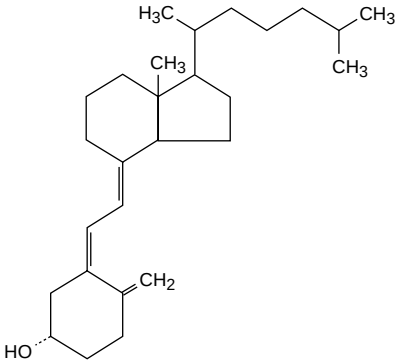
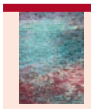


FIGURA 22.11
Estructura del 1α,25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol, la forma biológicamente activa de la vitamina D.



APLICACIÓN CLÍNICA 22.1
Contracepción oral

Los anticonceptivos orales suelen contener un estrógeno y una progestina. Al ingerirlos por vía oral, los niveles de dichos esteroides en la sangre aumentan de tal manera que se reprime la secreción de FSH y LH. En consecuencia, los niveles en la sangre de la hormona gonadotrópica descienden, por lo que la cantidad de FSH no basta para impulsar el desarrollo del folículo ovárico. Como resultado el folículo no madura y no se produce la ovulación. Además, la supervivencia de los cuerpos lúteos resulta imposible, ya que el nivel de LH es muy bajo. En definitiva, el ciclo ovárico se interrumpe. El endometrio uterino aumenta su grosor y permanece en este estado a causa de las elevadas cantidades de estrógeno y progestina. Normalmente, se insertan píldoras sin esteroides (placebos) en el régimen, en el vigésimo octavo día, con lo que los niveles de esteroides experimentan un gran descenso y se produce la menstruación. Cuando vuelven a ingerirse los esteroides anticonceptivos orales, los niveles sanguíneos de estrógeno y progestina se incrementan de nuevo y el endometrio uterino se hace más grueso. Esta secuencia crea un falso "ciclo" ya que la menstruación se produce en el momento esperado del ciclo. La contracepción oral, con la que se suprimen el ciclo ovárico y la ovulación, se basa en los efectos retroinhibitorios del estrógeno y la progestina sobre la secreción de las gonadotropinas de la hipófisis anterior. Es posible también conseguir la contracepción mediante la implantación en la piel de tubos de silicona que contengan progestinas. El esteroide se libera poco a poco, con lo que la contracepción se prolonga por espacio de tres a cinco años.

Zatuchni, G. I. Female contraception. En: K. L. Becker (Ed.), *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism.* New York: Lippincott, 1990, p. 861; y Shoupe, D. y Mishell, D. R. Norplant: subdermal implant system for long term contraception. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 160:1286, 1988.

pasa a sintetizar progesterona (y algo de estradiol) bajo la influencia de los elevados niveles de LH. Ahora bien, la progesterona es un retroinhibidor de las reacciones de síntesis y de liberación de LH (actúa a través de un receptor de progesterona de las células gonadotrópicas) y con el tiempo el cuerpo lúteo muere como consecuencia de la escasez de LH disponible y de la producción del agente luteolítico oxitocina por el propio cuerpo lúteo. Quizá la prostaglandina $F_{2\alpha}$ también esté relacionada con este proceso. Con la muerte del cuerpo lúteo, los niveles sanguíneos de progesterona y de estradiol disminuyen, lo que provoca la menstruación, así como una reducción de los efectos de retroinhibición de dichos esteroides en la hipófisis anterior y en el hipotálamo, con lo que el ciclo se inicia de nuevo. En la Apli. Clín. 22.1 se estudia la interrupción de este ciclo por parte de los anticonceptivos orales.

En el caso del varón, la situación es similar con respecto a la regulación de la secreción de gonadotropina, pero la LH actúa principalmente sobre las células de Leydig para estimular la producción de testosterona, mientras que la FSH actúa sobre las células de Sertoli para aumentar la producción de inhibina y de otras proteínas, entre las cuales hay una proteína de fijación de andrógenos. La producción de testosterona está sometida a un efecto de retroinhibición por parte del 17β-estradiol sintetizado por las células de Sertoli. El 17β-estradiol funciona a través de un receptor nuclear de estrógenos de las células de Leydig para inhibir la síntesis de la testosterona a nivel de transcripción. El sistema de biosíntesis de todas las hormonas esteroides es similar al que aparece en la Figura 22.4.

Vitamina D_3

La forma activa de la vitamina D, frecuentemente denominada **calcitriol**, es un **secoesteriode**, un esteroide en el cual uno de los anillos ha sido abierto (véase Figura 22.11). La forma activa de la vitamina D estimula la absorción intestinal del calcio y del fósforo que se ingieren con la dieta, la mineralización de la matriz ósea, la resorción ósea y la reabsorción del calcio y del fosfato en los túbulos renales. El **sistema endocrino de la vitamina D** se esboza en la Figura 22.12. El 7-deshidrocolesterol se activa en la piel por la acción de la luz solar produciendo **vitamina D_3 (colecalciferol)**. Esta forma se hidroxila, primero en el hígado para dar la **25-hidroxi vitamina D_3 (25-hidroxicolecalciferol)**, y a continuación en los riñones para generar la **1α,25-vitamina D_3 (1,25$(OH)_2D_3$) (1α,25-dihidroxicolecalciferol)**. Esta hormona se une a receptores nucleares de 1,25$(OH)_2D_3$ en el intestino, en los

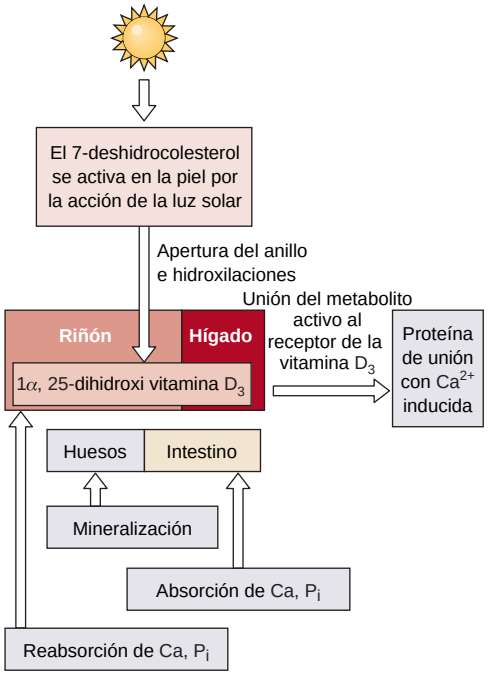


FIGURA 22.12
El sistema endocrino de la vitamina D.
P_i, fosfato inorgánico.
Adaptado de Norman, A. W. y Litwack, G. Hormones, 2nd ed. *New York: Academic Press, 1997, p. 379.*

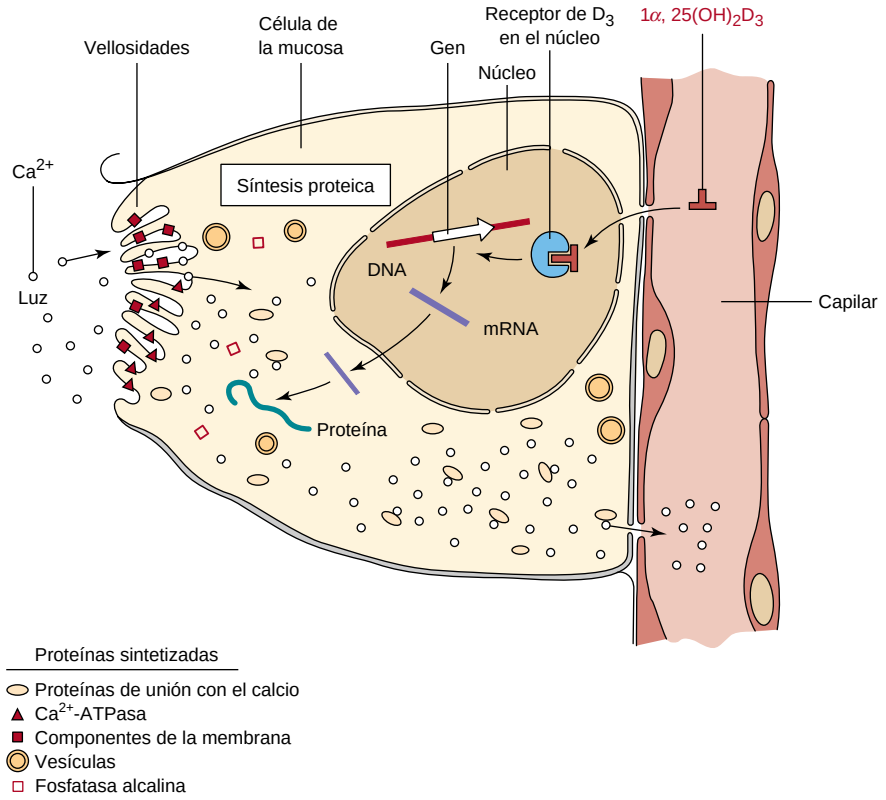


FIGURA 22.13
Modelo esquemático de la acción del $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ en el intestino estimulando el transporte de calcio intestinal.
Adaptado a partir de Nemere, I. y Norman, A. W. Biochim. Biophys. Acta *694:307, 1982.*

huesos y en los riñones para activar los genes que codifican proteínas de unión a calcio, cuyas acciones pueden conducir a la absorción y reabsorción del Ca^{2+} (y también del fósforo). La Figura 22.13 muestra los procedimientos de acción subcelular. En este diagrama, el calcitriol penetra en la célula intestinal desde la sangre y se desplaza hasta el núcleo, donde su receptor desocupado se encuentra asociado a la fracción cromatínica. Una vez la forma activa de la hormona se une a este receptor nuclear, el complejo se asocia a una secuencia de DNA específica, denominada elemento de respuesta a la vitamina D_3, y ello regula selectivamente la velocidad de transcripción de los genes sensibles a la hormona. Se produce RNA mensajero, que se traduce en el citoplasma; esos RNA codifican proteínas de unión a calcio, Ca^{2+}-ATPasa, otras ATPasas, componentes de la membrana, y facilitadores de la formación de vesículas. Los niveles incrementados de las proteínas de unión a calcio pueden producir una mayor captación de Ca^{2+} por parte del intestino o simplemente tamponar el citosol contra niveles elevados de Ca^{2+}.

En cada uno de los sistemas de producción de esteroides analizados, los controles de retroinhibición son operativos, siempre y cuando existan cantidades suficientes de la hormona esteroide circulante que inhiban una posterior producción y liberación de hormonas intermediarias de la ruta a nivel de la hipófisis y del hipotálamo, tal y como se muestra en la Figura 21.3 (véase p. 909). En el caso de los sistemas de la vitamina D, los controles son diferentes, ya que la producción de esteroides no se estimula mediante el proceso de cascada aplicable al estradiol. Cuando los niveles circulantes de la forma activa de la vitamina D ($1,25(OH)_2D_3$) son elevados, se favorecen las hidroxilaciones en las posiciones 24 y 25, lo que genera el compuesto inactivo $24,25(OH)_2$-vitamina D_3.

22.6 TRANSPORTE DE HORMONAS ESTEROIDES EN LA SANGRE

Las hormonas esteroides están unidas a proteínas plasmáticas específicas o a la albúmina

En la sangre existen cuatro proteínas plasmáticas principales a las que se unen las hormonas esteroides. Estas proteínas ayudan a mantener el nivel de estas hormonas en la circulación y las protegen del metabolismo y de la inactivación. Las pro-

teínas de unión son la globulina de fijación de corticoesteroides, la proteína de fijación de hormonas sexuales, la proteína de fijación de andrógenos y la albúmina.

La **globulina de fijación de corticoesteroides (CBG)** o **transcortina** es de unos 52 kDa y el plasma humano contiene 3–4 mg dL^{-1}. Une alrededor de un 80% del total de los 17-hidroxiesteroides en la sangre. En el caso del cortisol, que es el corticosteroide antiestrés más destacado en el ser humano, un 75% se une a la CBG, un 22% se une de forma débil a la albúmina, y un 8% está en forma libre. El cortisol libre es la forma que puede penetrar en las células y unirse a receptores intracelulares para producir efectos biológicos. La CBG presenta una gran afinidad para el cortisol, con una constante de unión (K_a) de $2{,}4 \times 10^7$ M^{-1}. Los determinantes estructurales más señalados en la unión de los esteroides a la CBG son los grupos Δ^4-3-cetona y 20-cetona. La aldosterona se une débilmente a la CBG, pero también se une a la albúmina y a otras proteínas plasmáticas. Por lo general, un 60% de la aldosterona se une a la albúmina y un 10% a la CBG. En el suero humano, la concentración de albúmina es mil veces mayor que la de CBG y se une al cortisol con una afinidad de 10^3 M^{-1}. En consecuencia, el cortisol siempre se unirá primero a los sitios de unión de la CBG. Cuando se produce una situación de estrés, y la secreción de cortisol es muy elevada, los sitios de la CBG se saturarán, pero habrá albúmina suficiente para unir el cortisol restante.

La **globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG)** (40 kDa) se une a andrógenos con una constante de afinidad de alrededor de 10^9 M^{-1}. De un uno a un tres por ciento de la testosterona circula en forma libre, un 10% se une a la SHBG y el resto, a la albúmina. Probablemente, el nivel de SHBG sea importante en el control del equilibrio entre los andrógenos y los estrógenos circulantes y las cantidades reales de hormonas que se producen en situaciones determinadas. Entre un 97 y un 99% de la testosterona unida se halla unida reversiblemente a SHBG. Sin embargo, la cantidad de estrógeno que se une a dicha proteína en la mujer es muy inferior. La concentración plasmática de SHBG antes de la pubertad es más o menos la misma en varones y mujeres, pero cuando ésta se inicia y el funcionamiento de las hormonas sexuales adquiere importancia, se produce un ligero descenso de la cantidad de SHBG en la mujer y un descenso más acusado en el caso del hombre. Este hecho asegura un aumento en la cantidad de testosterona y 17β-estradiol libres (forma activa). En los adultos, el hombre posee la mitad de SHBG que la mujer, por lo que el nivel de testosterona libre en el hombre es veinte veces superior. Además, la concentración de testosterona total (libre más unida) es unas cuarenta veces superior en el hombre que en la mujer. La testosterona por ella misma baja los niveles de SHBG en la sangre, mientras que el 17β-estradiol aumenta los niveles de SHBG en la sangre. Estos efectos tienen importantes consecuencias durante la gestación y en otras circunstancias.

La **proteína de fijación de andrógenos (ABP)** se produce en las células de Sertoli en respuesta a la testosterona y a la FSH, que estimulan la síntesis proteica en dichas células. La proteína de fijación de andrógenos no es de gran importancia para la circulación sanguínea en su conjunto, pero es importante ya que mantiene una provisión rápida de testosterona para la producción de constituyentes proteicos de los espermatozoides. Quizá su papel sea el de mantener una alta concentración local de testosterona en las proximidades de las células germinales en desarrollo que se hallan en el interior de los túbulos.

22.7 | RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides se unen a proteínas receptoras específicas intracelulares

En la Figura 22.14 se muestra un modelo general de la acción de las hormonas esteroides, el cual tiene en cuenta las diferencias entre receptores esteroides en lo concerniente a su localización en la célula. A diferencia de los receptores de hormonas polipeptídicas, que suelen estar situados sobre o en la superficie celular, los receptores de las hormonas esteroides, además de otros receptores relacionados para ligandos no esteroides (como por ejemplo la hormona tiroidea, el ácido retinoico, la vitamina D_3), se sitúan en el interior de la célula. Al parecer, existen ciertas diferencias entre los receptores de esteroides con respecto a la localización subcelular de las **formas que no se unen al DNA** de estos **receptores**. El receptor de los glucocorti-

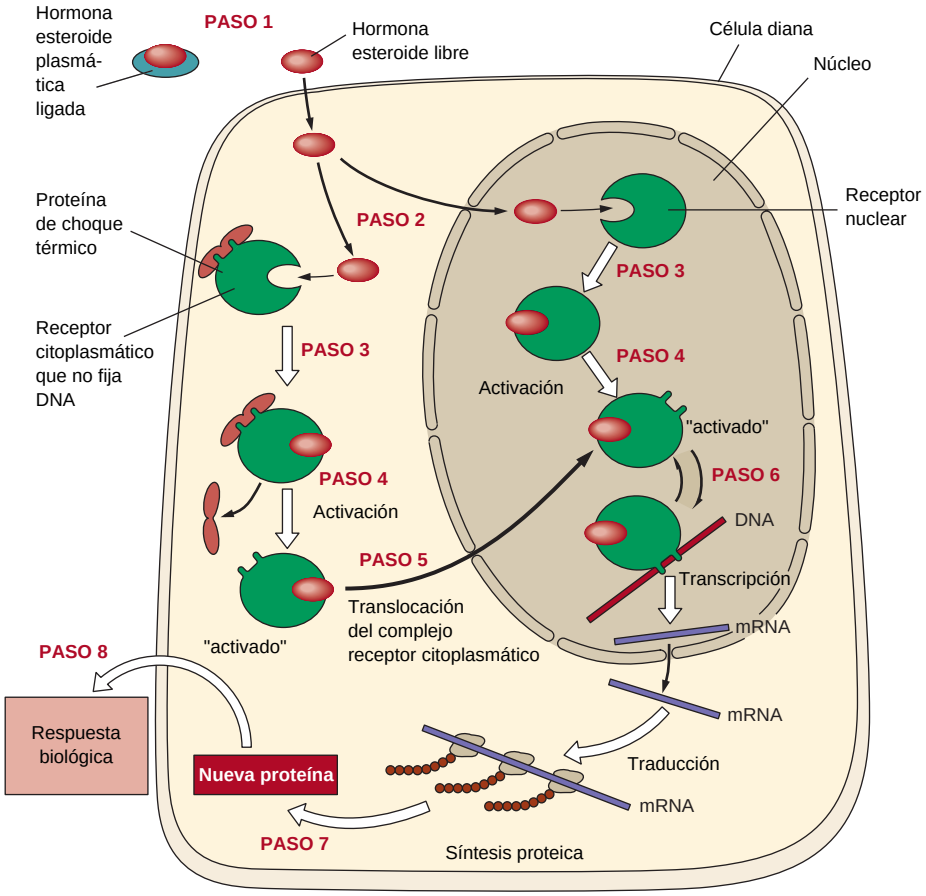


FIGURA 22.14
Modelo de la acción de las hormonas esteroides.
Paso 1: disociación de la hormona libre (biológicamente activa) de la proteína transportadora circulante; Paso 2: difusión del ligando libre al citosol o núcleo; Paso 3: fijación del ligando al receptor citoplasmático o nuclear inactivado; Paso 4: activación del complejo hormona–receptor citosólico o nuclear a la forma activada fijadora de DNA; Paso 5: translocación del complejo hormona–receptor citosólico activado al núcleo; Paso 6: fijación de complejos hormona–receptor activados a elementos específicos de respuesta del DNA; Paso 7: síntesis de nuevas proteínas codificadas en genes sensibles a las hormonas; Paso 8: alteración en el fenotipo o en la actividad metabólica de la célula diana debida a proteínas inducidas de manera específica.

coides y, posiblemente, el receptor de aldosterona parecen encontrarse en el citoplasma; por el contrario, los otros receptores, de los que poseemos información, podrían hallarse en el núcleo, probablemente asociados con el DNA, aunque no necesariamente en lugares aceptores productivos del DNA. En la Figura 22.14 (Paso 1) aparece una forma unida y otra libre de una hormona esteroide. La forma libre puede penetrar en la célula mediante un proceso de difusión. En el caso de los glucocorticoides, como el cortisol, el esteroide se uniría a un receptor no activado con un sitio abierto de unión al ligando (Paso 3). La constante de unión de esta reacción es del orden de $10^9\ M^{-1}$, mientras que la de la unión con CBG se sitúa alrededor de $10^7\ M^{-1}$ (véase el apartado anterior). La forma que no se une con el DNA, que también se denomina receptor no activado o sin transformar, tiene una masa molecular de unos 300 kDa, ya que otras proteínas podrían estar asociadas al complejo. Un dímero de una proteína de 90 kDa, que es una **proteína de choque térmico** que se forma cuando las células están en tensión, está asociado con el receptor en esa forma y oculta su dominio de unión con el DNA, lo que explica que no se una el DNA. A este dímero de hsp90 se encuentra asociada otra proteína de choque térmico, denominada hsp56, que, curiosamente, funciona además como inmunofilina y, como tal, se une a varios fármacos fuertemente inmunosupresores. El dímero de la proteína de choque térmico de 90-kDa se representa mediante dos óvalos de color rojo unidos al receptor citoplasmático, que bloquean el dominio de unión con el DNA. Éste se representa en forma de dos "dedos" en la forma activada posteriormente. La activación o transformación en la forma que se une al DNA se realiza mediante la liberación de las proteínas de choque térmico de 90 kDa (Paso 4). Aún se desconoce qué es lo que de hecho impulsa el paso o los pasos de activación. Sin duda alguna, la unión del ligando esteroide es importante, pero otros factores podrían estar involucrados. Se ha sugerido la existencia de un componente de baja masa molecular que forme parte del entrecruzamiento de las proteínas no homólogas y el receptor en el complejo de unión con el DNA. En el caso del receptor de glucocorticoides, la única forma que posee alta afinidad para la unión con el ligando esteroide es la que no se

une con el DNA. Después de la activación y de la exposición del dominio de unión con el DNA, el receptor se transloca hacia el núcleo (Paso 5), se une al DNA y lo "rastrea" para encontrar un sitio aceptor de gran afinidad. En ese sitio el complejo del receptor unido, frecuentemente un homodímero, actúa como un factor de transactivación, que, junto con otros transactivadores, permite la unión de la RNA-polimerasa y la estimulación de la transcripción. En algunos casos, la unión del receptor puede reprimir la transcripción, efecto sobre el que se conoce mucho menos. Los nuevos RNA mensajeros se translocan hacia el citoplasma a fin de formar complejos de traducción para la síntesis de proteínas (Paso 7) que alteran el metabolismo y el funcionamiento de la célula diana (Paso 8).

Cuando el receptor de las hormonas esteroides no ocupado se halla en el núcleo, tal como puede suceder con el receptor del estradiol, de la progesterona, de los andrógenos y de la vitamina D_3 (véase Figura 22.13), el esteroide debe desplazarse por el citoplasma y cruzar la membrana perinuclear. Este transporte a través del citoplasma (medio acuoso) podría requerir una proteína de transporte. Una vez en el interior del núcleo, el esteroide se une al receptor no ocupado, de gran afinidad, que posiblemente ya se halle en el DNA, y provoca su "activación" a una forma unida al sitio aceptor. El ligando podría favorecer una conformación que redujese la velocidad de disociación del receptor desde su aceptor, si se encuentra a corta distancia del sitio aceptor o en éste. Asimismo, podría hacer que el receptor inicie la búsqueda si el receptor no ocupado se une al DNA en un lugar distante del sitio aceptor. En consecuencia, el mecanismo existente tras la activación de los receptores nucleares no se conoce tan bien como el de los receptores citoplasmáticos. Después de la unión del complejo receptor activado en el sitio aceptor del DNA, tiene lugar la estimulación o inhibición de la transcripción.

Se ha demostrado claramente que existe heterogeneidad dentro de un subtipo determinado de receptor de esteroides. Por ejemplo, tanto en humanos como en roedores, los efectos transcripcionales del 17β-estradiol vienen mediados tanto por la forma **alfa** como la forma **beta** del **receptor de estrógeno** (**ERα** y **ERβ**, respectivamente). Tanto ERα como ERβ unen 17β-estradiol con la misma gran afinidad y ambos complejos activados se unen a elementos de respuesta a estrógeno dentro del DNA. ERα y ERβ comparten un elevado grado de homología de aminoácidos. No obstante, existen diferencias específicas en regiones de estos receptores de estrógeno que podrían influenciar la actividad transcripcional. ERα contiene dos dominios de activación distintos, AF-1 y AF-2, cuya actividad transcripcional viene influenciada por el contexto del promotor celular. Aunque ERβ contiene un dominio AF-2, no contiene un fuerte dominio AF-1 en la región amino terminal, sino un dominio represor. De acuerdo con esta diferencia estructural, se ha observado que ERβ funciona como inhibidor transdominante de la actividad transcripcional de ERα a niveles subsaturantes de hormona y que ERβ disminuye la sensibilidad celular global hacia 17β-estradiol. Una explicación de estos efectos inhibitorios de ERβ sobre la función de ERα es que ERβ puede formar **heterodímeros** con ERα, cosa que a su vez regula las funciones de ER. Análisis de los efectos específicos mediados por 17β-estradiol en ratones "knockout" para ERα o ERβ , junto con la observación de que estas dos formas de ER muestran patrones de expresión distintos, que solamente se solapan parcialmente, sugieren que estos dos receptores tienen funciones biológicas distintas. De hecho, cuando ERα y ERβ se coexpresan en neuronas, desencadenan señales intracelulares diferentes, que conducen a respuestas metabólicas distintas. Desde una perspectiva fisiológica, se ha sugerido que ERβ podría jugar un papel más importante en la diferenciación de las células neuronales, mientras que la activación de ERα podría estar implicada con la plasticidad sináptica, tanto durante el desarrollo como en las neuronas maduras. El útero es un tejido diana en el cual los receptores ERα y ERβ expresados endógenamente parecen jugar distintos papeles. El útero está compuesto de tipos celulares heterogéneos que sufren cambios sincronizados continuos sobre la velocidad de proliferación y la diferenciación en respuesta a cambios en los niveles circulantes de estrógenos y progesterona. Los niveles de ERα y de ERβ en el tejido uterino parecen variar también durante el ciclo menstrual, y encontramos el nivel más alto de ambos receptores durante la fase proliferativa. El 17β-estradiol juega un papel importante en la diferenciación del útero mediante la regulación de la expresión de genes diana, incluyendo la del **receptor de progesterona (PR).** La inducción de PR por el 17β-estradiol, tanto en tejido uterino como de mama, es fisiológicamente importante, ya

que prepara estos tejidos diana para su posterior estimulación con progesterona. Datos recientes demuestran que ERα parece ser responsable de esta inducción de PR en el estroma uterino y en las células epiteliales glandulares. Por el contrario, ERβ parece ser responsable de la disminución de PR en el epitelio luminal. De este modo, la expresión diferencial de ERα y de ERβ en tipos celulares específicos dicta qué tipo de respuesta se desencadenará con el 17β-estradiol.

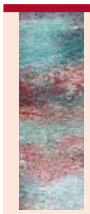
En la Tabla 22.4 se resumen las secuencias consenso de DNA que definen los **elementos de respuesta a hormonas (HRE)** específicos para la unión con diversos complejos receptores activados de hormonas esteroides. Los receptores de glucocorticoides, de mineralocorticoides, de progesterona y de andrógenos se unen al mismo HRE del DNA. Por lo tanto, en un tipo celular determinado, la cantidad y el tipo de receptor expresado determinará la sensibilidad a la hormona. Por ejemplo, los receptores de hormonas sexuales se expresan en tan sólo unos pocos tipos celulares y de la misma forma el receptor de progesterona está limitado a unas cuantas células. En cambio, el receptor de glucocorticoides se expresa en una amplia variedad de tipos celulares. Cuando se expresan a la vez receptores de la aldosterona y el cortisol, puede que predomine solamente una u otra forma, según los tipos celulares. Algunos tejidos, tales como el riñón o el colon, son dianas conocidas de la aldosterona y expresan niveles relativamente altos de receptores de mineralocorticoides, así como de receptores de glucocorticoides. Estos tejidos diana de mineralocorticoides expresan el enzima **11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa** (véase Apli. Clín. 22.2). Este enzima convierte el cortisol y la corticosterona, los cuales pueden unirse al receptor de mineralocorticoides con gran afinidad, en sus análogos 11-ceto, que se unen débilmente al receptor de mineralocorticoides. Esta inactivación de la corticosterona y el cortisol, que circulan a concentraciones mucho más elevadas que la aldosterona, facilita la unión de la aldosterona a los receptores de mineralocorticoides en estos tejidos. En tejidos que expresan receptores de mineralocorticoides, pero que no son considerados tejidos diana, puede que este enzima no se exprese y los receptores de mineralocorticoides pueden funcionar simplemente como pseudorreceptores de glucocorticoides, y mediar los efectos de niveles circulantes bajos de cortisol (glucocorticoide predominante en el ser humano). De esta forma, los receptores de mineralocorticoides y de glucocorticoides pueden regular la expresión de una red de genes solapados en varios tejidos diana. Tal como se indica en la Tabla 22.4, el complejo de estrógeno–receptor reconoce un único elemento de respuesta. Todos los elementos de respuesta reseñados en la parte superior de la Tabla 22.4 funcionan como elementos positivos, ya que la unión de los receptores produce un aumento de la transcripción del gen asociado.

Las hormonas glucocorticoides ocasionan también la represión de la transcripción de genes específicos. Se sabe, por ejemplo, que los glucocorticoides causan la represión de la transcripción del **gen de la proopiomelanocortina (POMC)**, que

TABLA 22.4 Elementos de respuesta del DNA a los receptores de hormonas esteroides: Sitios aceptores de consenso

Elemento	*Secuencia de DNA*[a]
POSITIVO	
Elemento de respuesta a los glucorticoides (GRE)	5′-GGTACAnnnTGTTCT-3′
Elemento de respuesta a los mineralocorticoides (MRE)	
Elemento de respuesta a la progesterona (PRE)	
Elemento de respuesta a los andrógenos (ARE)	
Elemento de respuesta a los estrógenos (ERE)	5′-*AGGT*CAnnnT*CACT*-3′
NEGATIVO	
Elemento de respuesta a los glucocorticoides	5′-*AT*YACNnnnTGATC*W*-3′

Fuente: Estos datos proceden del trabajo de Beato, M. *Cell* 56:355, 1989.
[a]n, cualquier nucleótido; Y, purina; W, pirimidina.



APLICACIÓN CLÍNICA 22.2
Síndrome del exceso aparente de mineralocorticoides

Algunos pacientes (generalmente niños) presentan síntomas, que incluyen hipertensión, hipocaliemia, y supresión del sistema de la renina–angiotensina–aldosterona, que son los que se esperarían si estuvieran hipersecretando aldosterona. Puesto que los ensayos biológicos del plasma y de la orina algunas veces no detectan ningún exceso de mineralocorticoides, se dice que estos pacientes sufren del síndrome del exceso aparente de mineralocorticoides (AME, apparent mineralocorticoid excess). Este síndrome está causado por el fallo en la inactivación del cortisol por el enzima 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esto hace que el cortisol tenga acceso directo al receptor de mineralocorticoides renal. Como el cortisol circula a concentraciones mucho mayores que la aldosterona, este glucocorticoide satura estos receptores de mineralocorticoides y funciona como un agonista, ocasionando retención de sodio y la supresión del eje renina–angiotensina–aldosterona. Aunque este síndrome AME puede derivar de un defecto congénito en la isoforma de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa del nefrón distal, que hace que el enzima sea incapaz de convertir el cortisol en cortisona (se une débilmente a los receptores de mineralocorticoides), puede adquirirse también por la ingestión de cantidades excesivas de regaliz. El componente principal de la regaliz es el ácido glicirrícico, y su producto de hidrólisis, el ácido glicirretínico (GE). Este ingrediente activo (GE) actúa como un potente inhibidor de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Al bloquear la actividad de este enzima inactivador, el GE facilita la unión del cortisol a los receptores de mineralocorticoides renales y por tanto induce el síndrome AME.

Edwards, C. R. W. Primary mineralocorticoid excess syndromes. En: L. J. DeGroot (Ed.), *Endocrinology.* Philadelphia: Saunders, 1995, p. 1775; y Shackleton, C. H. L. y Stewart, P. M. The hypertension of apparent mineralocorticoid excess syndrome. En: E. G. Biglieri y J. C. Melby (Eds.), *Endocrine Hypertension.* New York: Raven Press, 1990, pp. 155–173.

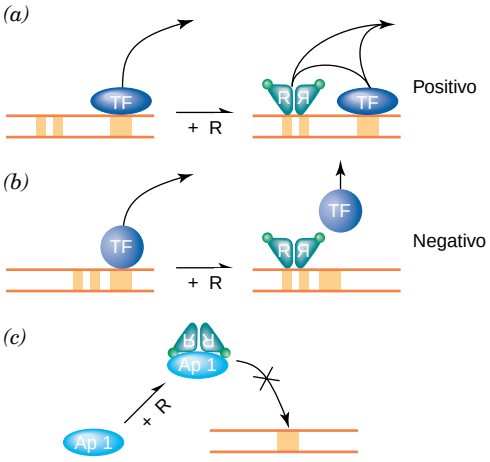


FIGURA 22.15
Efectos transcripcionales positivos y negativos de los receptores de esteroides. TF, factor de transcripción; R, receptor. (*a*) La unión del receptor dimérico justo al lado de un factor de transcripción produce una activación sinérgica de la transcripción. (*b*) La unión del receptor dimérico a un elemento de respuesta a hormona (HRE) negativo puede desplazar un factor de transcripción positivo. (*c*) La interacción proteína-proteína entre el receptor dimérico y un factor de transcripción positivo, como Ap1, puede bloquear la unión de Ap1 al DNA y reprimir la respuesta transcripcional.
Adaptado de Renkawitz, R. Ann. N. Y. Acad. Sci. *684:1, 1993.*

contiene las secuencias de ACTH. La represión de la expresión del gen *POMC* mediada por glucocorticoides juega, pues, un papel clave en el bucle de retroinhibición negativa que regula la velocidad de secreción de la ACTH y, en último término, del cortisol. Los elementos de respuesta negativa a glucocorticoides (nGRE) son mediadores de la represión del gen *POMC*, así como de otros genes importantes. En la Figura 22.15 se muestra un modelo general de los efectos sobre la transcripción, tanto positivos como negativos, mediados por receptores de esteroides: en (*a*) la unión de un homodímero de un receptor de esteroides (R) a su elemento de respuesta permite que éste interaccione de modo sinérgico con un factor de transcripción (TF) positivo, y por tanto induce la transcripción génica; en (*b*) la unión de un dímero de un receptor a su elemento de respuesta desplaza un factor de transcripción (TF) positivo, pero no tiene un potencial de transactivación, o es muy débil, al no haber un factor sinérgico en las cercanías; y en (*c*) el DNA-AP1 (factor positivo) puede establecer una interacción proteína–proteína de manera tal que las funciones transactivadoras de ambas proteínas sean inhibidas y se reprima la transcripción génica.

Tanto los glucocorticoides endógenos como los exógenos ejercen importantes acciones antiinflamatorias y estos esteroides se han utilizado durante décadas con este objetivo. Estas hormonas endógenas y sintéticas parecen suprimir el sistema inmunitario mediante diversos mecanismos bioquímicos. Por ejemplo, se sabe que los glucocorticoides inhiben las respuestas inmunitarias mediante la inhibición de la producción de **prostaglandinas**. Se ha demostrado que los complejos nucleares glucocorticoide–receptor (véase Figura 22.16) inducen la **anexina-I** (también denominada **lipocortina**), una proteína de unos 40 000 de masa molecular. Este polipéptido funciona como inhibidor de la fosfolipasa A_2 de membrana, cuya actividad es responsable de la liberación de precursores de ácidos grasos, como el ácido araquidónico, para la síntesis de prostaglandina. Se sabe que los glucocorticoides inhiben también la expresión de la **ciclooxigenasa** (véase p. 767), que cataliza la generación de prostaglandinas y otros compuestos relacionados que son potentes agentes antiinflamatorios. Existen dos formas de ciclooxigenasa: **COX1** y **COX2**. Parece ser que COX1 es un enzima que se expresa constitutivamente, el cual podría funcionar en respuestas vasculares y podría catalizar la generación de las hormonas requeridas bajo condiciones no inflamatorias. Por otro lado, el enzima COX2 (prostaglandina G/H sintasa-2) puede ser inducido en células inflamatorias como parte de la respuesta inflamatoria. Este enzima del retículo endoplasmático cataliza la oxidación del ácido araquidónico a la forma peroxi (endoperóxido cíclico). A partir de este intermediario se pueden sintetizar un buen número de prostaglandinas y tromboxanos (mediadores de la respuesta inflamatoria) y de prostaciclinas. Esta supresión de la síntesis de COX2 mediante glucocorticoides explica la mayor parte de sus efectos antiinflamatorios.

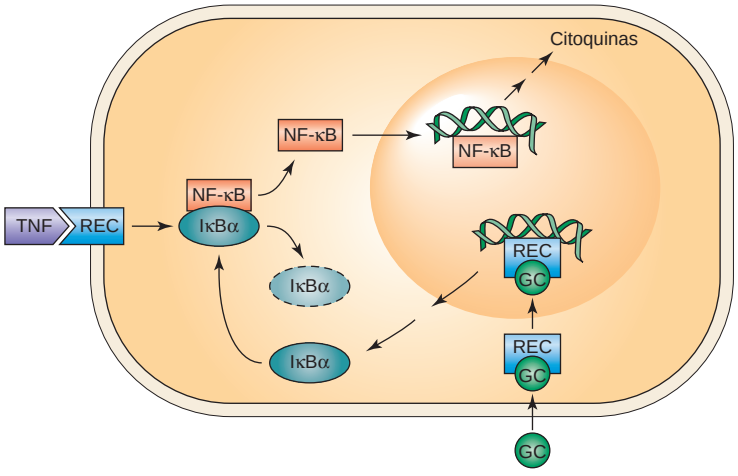


FIGURA 22.16
Acción de los glucocorticoides en la supresión de las respuestas inmunitaria e inflamatoria mediadas por citoquinas.
REC, receptor; GC, hormonas glucocorticoides; TNF, factor de necrosis tumoral.
Reproducido de Marx, J. Science *270:232, 1995.*

Los glucocorticoides son antiinflamatorios mediante otro mecanismo que implica la inhibición de un factor de transcripción clave. En células inmunitarias no estimuladas, el factor de transcripción **NF-κB** se encuentra retenido en el citoplasma en su forma inactiva acomplejada con otra proteína, bien la **1κBα** bien la **1κBβ**, proteína estructuralmente relacionada a la anterior. La estimulación de estas células mediante una de la distintas señales inmunitarias, como puede ser el factor de necrosis tumoral, produce la fosforilación de **1κBα** en las serinas 32 y 36. Esta modificación postraducción, que induce la ubiquitinación y posterior degradación de **1κBα** a través de un mecanismo mediado por el proteosoma, provoca la liberación de NF-κB del complejo citoplasmático. El NF-κB liberado (activado) migra a continuación hacia el núcleo, donde activa la citoquina (mediadores de la inflamación) y otros genes. Los glucocorticoides suprimen de forma efectiva esta activación de células inmunitarias mediante dos mecanismos (véase Figura 22.16). Estos esteroides, a través de la unión con receptores intracelulares, inducen la transcripción de 1κBα y este 1κBα adicional retiene NF-κB en el citoplasma en su forma inactiva, incluso bajo condiciones en que se liberaría normalmente para desplazarse hacia el núcleo. Además, la unión potencial de los complejos nucleares activados de complejos glucocorticoide-receptor con el NF-κB nuclear podría impedir que éste último se uniera a los elementos de respuesta del DNA apropiados y contribuir a la inmunosupresión mediada por esteroides.

Algunos miembros de esta superfamilia de genes de receptores pueden ocasionar el silenciamiento de genes. Los elementos silenciadores del DNA, en analogía con los elementos potenciadores, funcionan de forma independiente de su posición y orientación. El silenciador de un gen determinado consiste en módulos que reprimen la actividad del gen de forma independiente. En ausencia de sus ligandos específicos, el **receptor de la hormona tiroidea** (T_3R) y el **receptor del ácido retinoico** (RAR), parece que unen elementos silenciadores específicos y reprimen la transcripción génica. Esta actividad silenciadora puede llevarse a cabo bien a través de la desestabilización del complejo de inicio de la transcripción, o a través de efectos directos o indirectos sobre el dominio C-terminal de la RNA polimerasa II. Una vez unidos a sus respectivos ligandos, estos dos receptores pierden su actividad silenciadora y se convierten en transactivadores de la transcripción génica.

Para la mayoría de los receptores de esteroides, la dimerización de los receptores monoméricos es un requisito previo para la unión eficiente al DNA y la activación de la transcripción, tal y como se indica en la Figura 22.15. Las fuertes interacciones entre estos monómeros se dan a través de los dominios de unión a ligando de varios receptores de esteroides. Se ha sugerido que el dominio de dimerización del dominio de unión a ligando forma una estructura de tipo cremallera de leucinas, o un motivo estructural de tipo cremallera-hélice-giro (véase p. 387). Es conocido que estos motivos son necesarios para la dimerización de otros factores de transcripción. Aunque la mayoría de los receptores de esta superfamilia forman homodímeros, también se han detectado heterodímeros. En concreto, una determinada clase de receptores del ácido retinoico, que se clasifican como receptores retinoides X (RXR), regulan la expresión génica a través de la heterodimerización con el otro tipo de receptores del ácido retinoico (RAR), el receptor de la hormona tiroidea, y otros miembros de esta superfamilia de receptores. En la Figura 22.17 se presenta un modelo de la estabilización del complejo de preinicio de la transcripción por un heterodímero RXR/RAR.

Así pues, los cambios producidos en diferentes células por la activación de receptores de hormonas esteroides pueden ser diferentes. El proceso completo es desencadenado por la entrada del ligando esteroide en cantidades que desbordan a la constante de disociación del receptor. A continuación se suman los cambios fenotípicos en los diferentes tipos de células en respuesta a una hormona específica para dar la respuesta sistémica u organísmica a la hormona.

Algunos receptores de esteroides forman parte de la familia c-*Erb*A de protooncogenes o son receptores huérfanos

El receptor de glucocorticoides presenta tres **dominios funcionales** principales (Figura 22.18). Si empezamos por el extremo C terminal, hallamos el dominio de fijación del esteroide, que posee una homología de entre un 30 y un 60% con los **dominios de fijación de ligando** de otros receptores de la familia de los receptores de esteroides. Cuanto más se parezcan dos esteroides que se unen a distintos receptores, mayor será la homología esperable en este dominio. El dominio de fijación del

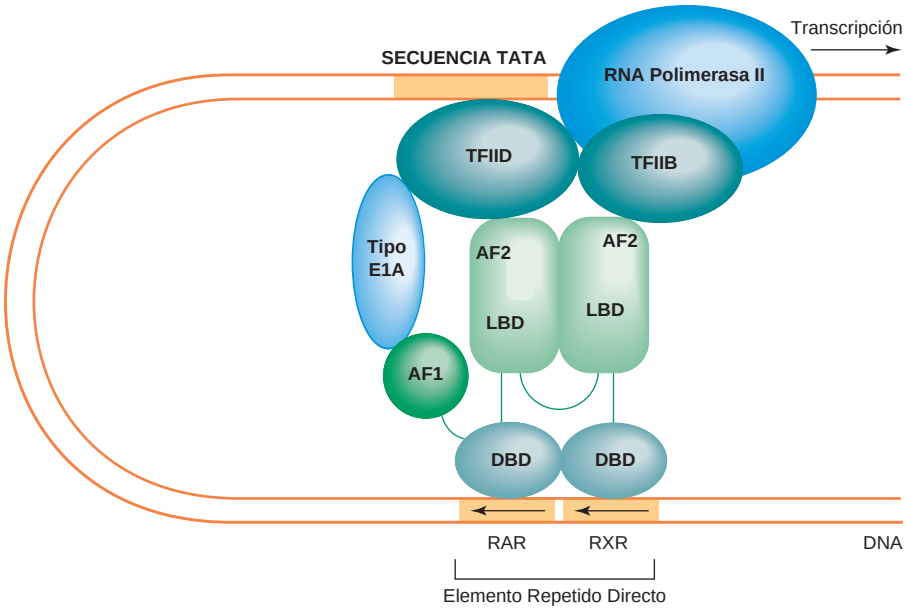


FIGURA 22.17
Modelo de la estabilización del complejo de preinicio por un heterodímero RXR/RAR.
TF, factor de transcripción; LBD, dominio de unión al ligando; DBD, Dominio de unión al DNA; AF1, función de activación localizada en la región amino terminal del receptor, que puede proporcionar contacto con proteínas específicas de la célula; AF2, función de activación situada dentro del dominio de unión a ligando, que interacciona directamente con la maquinaria de transcripción.

esteroide posee una secuencia que quizás esté relacionada con la unión del molibdato, así como con un dímero de la proteína de choque térmico de 90 kDa, cuya función sería la de ensamblar el complejo receptor de esteroides no activado y sin transformar, que posee una elevada masa molecular. A la izquierda de ese dominio existe una zona que modifica la transcripción. En el centro de la molécula se halla el **dominio de fijación de DNA**. La homología entre los diferentes receptores de esteroides en este dominio es de un 60 a un 95%. Existen dos dedos de zinc (véase p. 388) que interaccionan con el DNA. La estructura del motivo de unión con el DNA del dedo de zinc se muestra en la Figura 22.19. El dominio N-terminal contiene los principales **dominios antigénicos** y un sitio que modula la activación de la transcripción. Las secuencias de aminoácidos en este sitio varían mucho de unos receptores de esteroides a otros. Estas características son comunes a todos los receptores de esteroides. En la Figura 22.20 se esquematiza la familia de receptores de esteroides. El antepasado con el que están relacionados estos genes de receptores es v-*erb*A o c-*erb*A. v-*Erb*A es un oncogén que se une al DNA, pero que no posee ningún dominio de fijación de ligando. En algunos casos, los dominios de fijación al DNA son tan homólogos que más de un receptor se une a un elemento de respuesta común (secuencia consenso del DNA), tal como se muestra en la Tabla 22.4. Además de los genes que aparecen en la Figura 22.20, el **receptor de hidrocarburos arílicos** (Ah) también podría ser un miembro de esta familia. El receptor Ah se une a carcinógenos con una afinidad creciente de forma paralela con la potencia carcinogénica, y traslada el carcinógeno al núcleo celular, siempre y cuando el receptor no se encuentre ya en el núcleo. La región N-terminal de los receptores suele poseer los principales sitios antigénicos, y también es posible que contenga un sitio que actúa modulando la unión entre el receptor y el DNA.

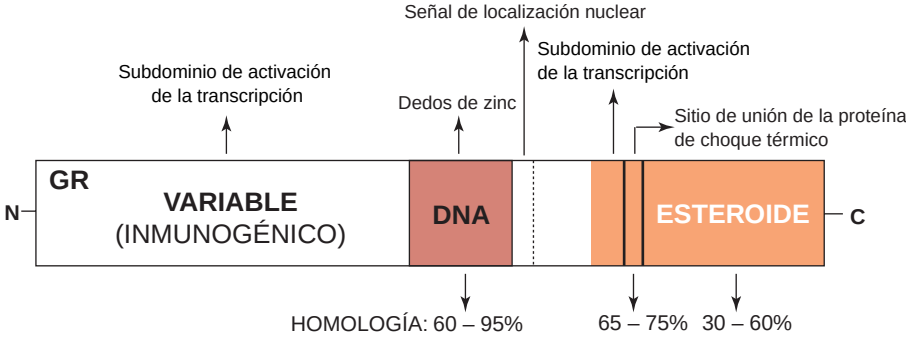


FIGURA 22.18
Modelo de un receptor típico de hormonas esteroides.
Los resultados se han extraído de estudios sobre cDNA realizados en numerosos laboratorios, entre los que destacan los de R. Evans y K. Yamamoto.

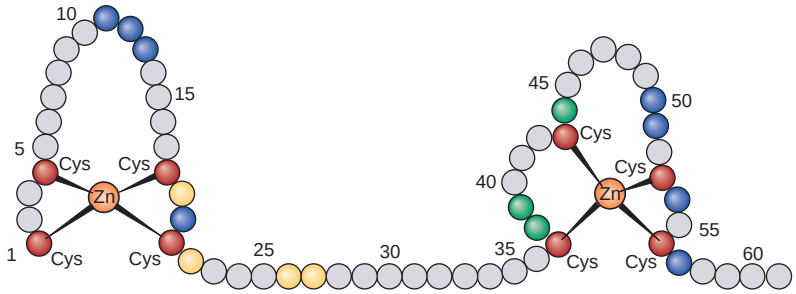


FIGURA 22.19
Estructura determinada por cristalografía de rayos X del dedo de zinc situado en el dominio de unión a DNA del receptor de glucocorticoides.
Los círculos amarillos indican residuos aminoácidos (situados en el monómero de GR) que interaccionan con pares de bases. Los círculos azules corresponden a los que establecen contactos con los fosfatos de la cadena. Los círculos verdes son los que participan en la dimerización.
Adaptado de Luisi, B. F., Schwabe, J. W. R. y Freedman, L. P. En: G. Litwack (Ed.), Vitamins and Hormones, *Vol. 49. San Diego: Academic Press, 1994, pp. 1–47.*

Los receptores de la hormona tiroidea y los del ácido retinoico también forman parte de esta superfamilia de receptores, aunque sus ligandos no son esteroides. Estos ligandos poseen anillos de seis átomos, tal y como se muestra en la Figura 22.21. En algunos de los receptores de esteroides el anillo A es el sitio más importante de reconocimiento por parte del receptor, y es probable que el anillo A se inserte en la cavidad de unión del receptor. En algunas ocasiones, derivados que poseen un anillo de seis átomos se unen a los receptores del estradiol y de los glucocorticoides. Por lo tanto, las estructuras anulares de la hormona tiroidea y del ácido retinoico presentan similitudes estructurales parecidas a las de muchos ligandos esteroides que intervienen en la unión.

De este modo, todos los receptores de esta gran familia génica, actuando bien como homodímeros, bien como heterodímeros, funcionan como factores de transcripción activados por ligando y, como tales, modulan (inducen o reprimen) la expresión de genes específicos.

Existe un gran número de receptores relacionados que se denominan **receptores huérfanos**. Aunque estos receptores nucleares están estructuralmente relacio-

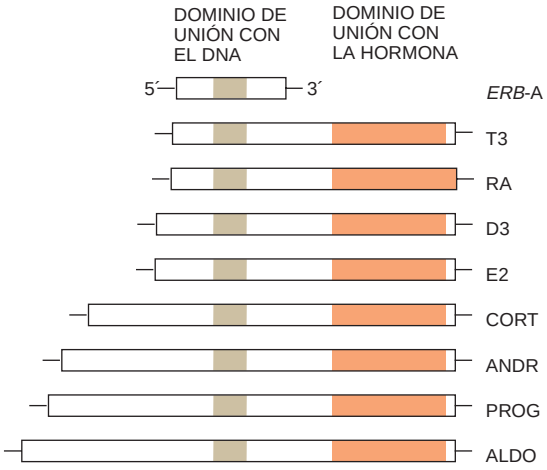
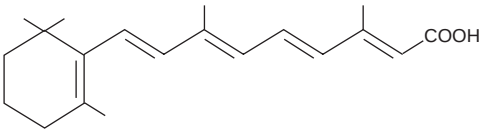


FIGURA 22.20
Superfamilia de los genes de los receptores de esteroides.
T3, triyodotironina; RA, ácido retinoico; D3, dihidroxivitamina D_3; E2, estradiol; CORT, cortisol; ANDR, andrógeno; PROG, progesterona; ALDO, aldosterona. Esta figura muestra de forma muy general el tamaño relativo de los genes de estos receptores. La información procede de los laboratorios de R. Evans, K. Yamamoto, P. Chambon, y otros. En algunos casos, existe una gran homología en los dominios de unión con el DNA, mientras que la similitud es menor en los dominios de unión con el ligando.



Ácido retinoico
(ácido de la vitamina A)

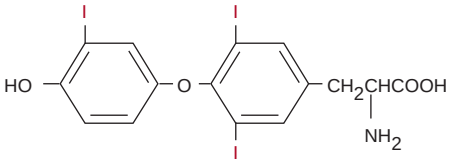


FIGURA 22.21
Estructura del ácido retinoico (ácido de la vitamina A) y de la 3,5,3′-triyodotironina.

nados con receptores conocidos de esta superfamilia, originalmente no se conocía ni los ligandos fisiológicos ni los activadores de estos receptores huérfanos. En conjunto, estos receptores representan un componente diverso y antiguo de la superfamilia de receptores nucleares y se encuentran en casi todas las especies animales. Se ha identificado el ligando de varios receptores huérfanos como, por ejemplo, los siguientes: **BXR (receptor *X* de benzoato), RXR (receptor *X* de retinoides), PPAR (receptor activado por proliferadores de peroxisoma), CARβ (receptor constitutivo de androstano), PXR (receptor *X* de pregnano), SXR (receptor de esteroides** y **xenobióticos)** y **FXR (receptor *X* de farnesoides)**. PXR, SXR y CARβ se expresan en altos niveles en el hígado y responden a ligandos esteriodes específicos. Estas hormonas son, de hecho, los primeros ligandos esteroides descritos desde que se descubriera la aldosterona en 1952. Se sabe que estos tres receptores huérfanos que responden a ligando necesitan heterodimerización con RXR para que se produzca unión al DNA. Estos receptores huérfanos descubiertos recientemente y sus respectivos ligandos pueden tener una clara importancia fisiológica y tienen un efecto sobre enfermedades humanas específicas. Por ejemplo, el SXR humano puede ser activado por un grupo diverso de agonistas y antagonistas de esteroides. La activación de este receptor sensible de amplia especificidad parece facilitar la destoxificación y eliminación de diversas hormonas endógenas, esteroides de la dieta, fármacos y compuestos xenobióticos con actividad biológica. El complejo SXR activado por ligando parece regular directamente la actividad de los enzimas citocromo P450 inducibles en respuesta a la presencia de sus sustratos. De este modo, el SXR activado aumenta el catabolismo de esteroides mediante la inducción de la transcripción de diversos genes que codifican enzimas metabolizantes clave. Así pues, en pacientes que siguen una terapia de reemplazo hormonal o en mujeres que toman anticonceptivos orales, se ha observado que ciertos fármacos (p. ej., rifampicina) que se unen a SXR producen una rápida disminución de los esteroides administrados, debido a este catabolismo de esteroides incrementado.

22.8 | ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES: REGULACIÓN POSITIVA Y REGULACIÓN NEGATIVA

Apenas si poseemos datos acerca de la activación de los receptores de esteroides. La activación convierte una forma del receptor que no se une a DNA (inactiva y no transformada) en otra forma (activa y transformada) capaz de unirse a un DNA no específico o específico (el elemento de respuesta a la hormona). La probabilidad de que algunos receptores sean citoplasmáticos (el receptor de los glucocorticoides y, posiblemente, el de los mineralocorticoides), mientras que otros sean nucleares (los de la progesterona, el estradiol, la vitamina D_3 y los andrógenos) podría estar relacionada con la importancia del fenómeno de activación. Los receptores citoplasmáticos son los más conocidos. El modelo aceptado actualmente considera que la forma que no se une al DNA es un trímero heteromérico que consta de una molécula de receptor y de un dímero de una proteína de choque térmico de 90 kDa, tal y como se muestra en la Figura 22.22. El sitio de unión con el DNA del receptor se bloquea por la acción de las proteínas heteroméricas, por algún otro factor o por la combinación de ambos. Después de la activación y la transformación, podría producirse una disgregación escalonada de dicho complejo, lo que causaría la completa exposición del sitio de unión del DNA en el receptor ya activado.

A pesar de que se conocen bien las condiciones para llevar a cabo una activación *in vitro*, aún ignoramos cuál es la señal primaria en la célula. Muchos creen que la unión del ligando no basta para iniciar el proceso de activación. Está claro que para que este cambio conformacional tenga lugar es necesaria una temperatura elevada, ya que la incubación de células diana con esteroides apropiados a bajas temperaturas no provoca la activación *in vivo* ni la posterior translocación. Una vez que el receptor liberado se halla en el citoplasma, cruza la membrana perinuclear, quizá a través de un nucleoporo, para acceder al núcleo. Se une de forma específica y no específica a la cromatina, probablemente en forma de dímero, a fin de buscar el elemento de respuesta específico (Tabla 22.4). Así pues, estos receptores son factores transactivadores que pueden actuar junto con otros factores del mismo tipo para proporcionar una estructura que permita iniciar la transcripción. La mayoría de los receptores de esteroides poseen una secuencia parecida a SV-40 (a saber, Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val) en sus sitios de unión con el DNA, que codifica la translocación nuclear. Los recep-

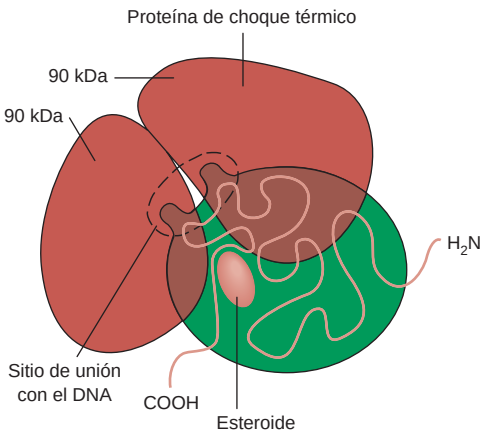


FIGURA 22.22
Modelo hipotético de una forma de un receptor de esteroides que no se une al DNA. Esta forma del receptor no puede unirse al DNA porque el sitio de unión con el DNA está bloqueado por proteínas hsp de 90 kDa o por algún otro constituyente. La masa molecular de este complejo es de unos 300 kDa.

tores de esteroides presentan algunas variantes de esta secuencia, ya que se permite una cierta degeneración, pero probablemente exista un residuo específico de lisina que no puede ser alterado. Esta señal puede servir para reconocer el nucleoporo.

Los receptores de esteroides pueden regularse positiva o negativamente según su exposición a la hormona

La actividad de muchos receptores, en la membrana o en el interior celular, disminuye cuando la célula ha sido expuesta a una cierta cantidad del ligando hormonal. En algunos casos, la disminución de actividad se denomina "insensibilización". La **disminución de la actividad (downregulation)** puede adoptar diversas formas. En los receptores de membrana, el mecanismo puede ser la internalización mediante endocitosis de los receptores después de su exposición a la hormona. La internalización reduce el número de receptores disponibles en la superficie celular y hace que la célula sea menos sensible ante la hormona; es decir, que insensibiliza la célula. En el caso de los receptores de esteroides intracelulares, el mecanismo de disminución de la actividad consiste normalmente en reducir el nivel del mRNA del receptor, con lo que desciende la concentración de moléculas del receptor. El gen del receptor podría tener un elemento de respuesta específico en su promotor, cuya acción daría como resultado una inhibición de la transcripción del mRNA del receptor; o el receptor podría estimular la transcripción de un gen que codifique una proteína que degrada el mRNA del receptor. Se están reconociendo secuencias en promotores de los genes de algunos receptores, que podrían unir complejos de esteroide–receptor activado que provocasen la inhibición de la transcripción (Tabla 22.4). La regulación negativa de los receptores por sus propios ligandos juega un importante papel fisiológico al prevenir la sobreestimulación de las células diana cuando los niveles circulantes de hormona son elevados.

Aunque la regulación negativa de los niveles de receptores de esteroides por sus correspondientes hormonas parece ser la forma más frecuente de autorregulación, no es común a todas las células diana. De hecho, se ha detectado regulación positiva inducida por glucocorticoides en varias células sensibles. Puesto que para todas estas células las hormonas inhiben el crecimiento, se sugirió inicialmente que la regulación positiva inducida por hormonas podría ser necesaria para la posterior inhibición del crecimiento. Sin embargo, el hecho de que la regulación positiva inducida por glucocorticoides tenga lugar también en células linfoides humanas, que expresan receptores de glucocorticoides pero cuyo crecimiento no es inhibido por estos esteroides, demuestra que esta **autorregulación** positiva no es ni el efecto ni la causa de la detención del crecimiento inducida por hormonas (véase Apli. Clín. 22.3).

Receptores hormonales del núcleo y coactivadores y correpresores

Entre los diversos niveles de control que se ejercen sobre la acción hormonal se incluyen la disponibilidad de ligando para su receptor, el grado de expresión del receptor específico en la célula y factores específicos de la célula. Las proteínas que regulan las funciones transactivacionales de los receptores nucleares se denominan **coactivadores** y **correpresores**. Los coactivadores de los receptores de esteroides son proteínas que se unen al receptor mientras éste está en contacto con el DNA y facilita estructuralmente la subsiguiente transcripción, un estado del complejo conocido como *activación*. En el estado inactivo, el receptor, mientras está unido al DNA en el promotor de un gen específico gobernado por un elemento de respuesta a hormona, entra en contacto con otro conjunto de proteínas, los correpresores, que interfieren estructuralmente con el estado transcripcional activado del complejo. SMRT y NCoR (GRIP1 está también en esta categoría, pues se parece a NCoR) son correpresores de receptores nucleares de hormonas esteroides bien caracterizados. Estos correpresores afectan a mSin3 y a las histona desacetilasas (HDAC) causando desacetilación de las histonas, lo que produce la condensación de la cromatina, dando como resultado una represión de la transcripción. La unión del ligando hormonal específico con el complejo receptor induce una alteración conformacional del receptor, dando como resultado la disociación de los correpresores y el reclutamiento de coactivadores. Estos coactivadores catalizan entonces la acetilación de las histonas y conducen a la activación de la transcripción (véase Figura 22.23). Los coactivadores son proteínas de la familia SRC y se denominan SRC-1, SRC-2 y SRC-3. Los SRC interaccionan con los receptores a través de unos motivos conservados con la secuencia de aminoácidos LXXLL, donde L es leucina y X un aminoácido cualquiera.

APLICACIÓN CLÍNICA 22.3

La mutación del receptor de mineralocorticoides produce la hipertensión y toxemia del embarazo

Un descubrimiento muy reciente aporta una explicación molecular de una forma hereditaria de la hipertensión y una posible base molecular para la toxemia del embarazo, también conocida como eclampsia. Las causas de la hipertensión, especialmente la asociada a eclampsia, son solamente conjeturas y los puntos finales moleculares específicos que se han implicado incluyen el sistema renina–angiotensina y varios factores relacionados con este sistema, incluyendo el enzima convertidor del angiotensinógeno y el receptor de mineralocorticoides. Este receptor de esteroides se activa normalmente por acción de la aldosterona, lo cual promueve la reabsorción de sodio en el nefrón distal del riñón. No obstante, un estudio reciente se ha centrado en la hipertensión que ocurre a veces durante el embarazo y se ha descrito una nueva mutación del receptor de mineralocorticoides. En este receptor mutado, el residuo de serina de la posición 810 ha sido substituido por un residuo de leucina (se denomina mutación S810L). Este receptor mutado parece ser responsable de la hipertensión que aparece pronto en el embarazo y que se magnifica a lo largo de éste (aproximadamente el 6% de los embarazos se complican debido al desarrollo de hipertensión). El aminoácido serina 810 se localiza en el dominio de unión a hormona del receptor y está conservado en todos los receptores de mineralocorticoides de muchas especies. Como consecuencia de esta mutación específica en el dominio de unión a hormona, el receptor de mineralocorticoides une progesterona con la misma alta afinidad con que une aldosterona. Aunque la progesterona se une al receptor de mineralocorticoides normal tipo salvaje, lo hace con baja afinidad y funciona como un antagonista. No obstante, la progesterona unida a la forma mutada del receptor funciona como un agonista, de modo que activa el receptor e induce una respuesta fisiológica (reabsorción de sodio en el riñón). Dado que durante el embarazo los niveles de progesterona plasmática aumentan significativamente (véase Figura 20.35), esta forma mutada del receptor está continuamente saturada con este esteroide. Como consecuencia del funcionamiento de la progesterona como agonista, la presión sanguínea de la mujer embarazada que expresa este receptor mutado puede alcanzar niveles muy altos y peligrosos. Por ejemplo, en personas menores de 35 años portadoras de la forma mutada del receptor, se observó que la relación de la presión sanguínea sistólica/diastólica era 167/110, mientras que la relación era 126/78 (intervalo normal) en no portadoras. Muchos otros esteroides no pueden unirse ni a la forma normal (tipo salvaje) ni a la forma mutada de este receptor. No obstante, la espironolactona, que al unirse al receptor normal suele funcionar como un antagonista de la aldosterona, también funciona como un agonista cuando se une al receptor mutado. Por lo tanto, probablemente no se debería usar la espironolactona para tratar pacientes hipertensos que tienen la mutación S810L en su receptor de mineralocorticoides. Como el desarrollo temprano de fallo cardíaco ocurre en el grupo de paciente seriamente hipertensos, es posible que este receptor de mineralocorticoides mutado sea un factor contribuyente importante.

Geller, D. S., Farhi, A., Pinkerton, N., Fradley, M., Moritz, M., Spitzer, A., Meinke, G., Tsai, F. T. F., Sigler, P. B. y Lifton, R. P. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289:119, 2000.

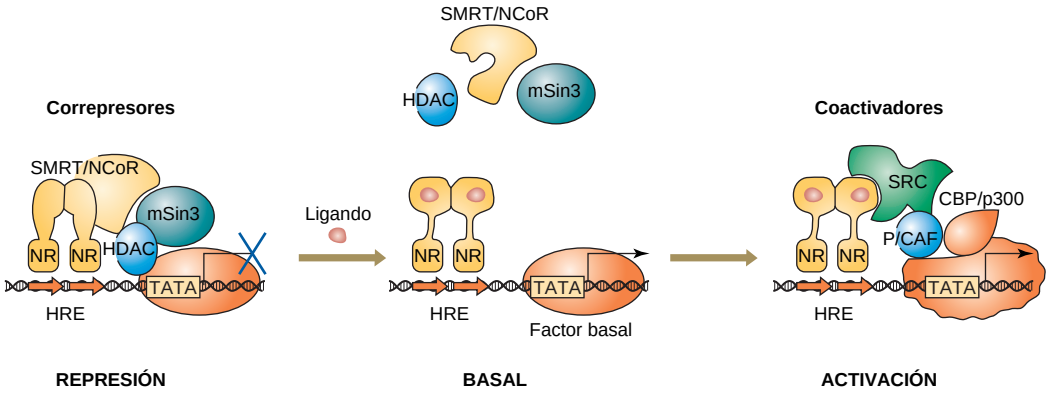
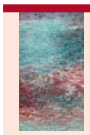


FIGURA 22.23
Papel de los correpresores y coactivadores en la regulación de la transcripción mediada por receptores de hormonas esteroides/nucleares.
HRE, elemento de respuesta a hormona; NR, receptor nuclear; SMRT, NCoR, correpresores; HDAC, histona desacetilasa; P/CAF, histona acetiltransferasa; SRC, coactivador; mSin3, represor de la transcripción que se une a factores represores de la transcripción y recluta la HDAC hacia el complejo represor; CBP/p300, activador de la transcripción general. Este modelo es válido únicamente para los receptores nucleares que se unen al DNA en ausencia de un ligando específico.

22.9 EJEMPLOS ESPECÍFICOS DE LA ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES A NIVEL CELULAR: MUERTE PROGRAMADA

La muerte celular programada o **apoptosis** es un proceso mediante el cual las células mueren de acuerdo con un programa que puede resultar beneficioso para el organismo. Ésta ocurre como resultado de un aumento o una disminución del nivel de una hormona u hormonas específicas. Las células endometriales del útero al principio de la menstruación constituyen un ejemplo en el cual la muerte celular programada se inicia por la reducción de los niveles de progesterona y estradiol en la sangre (véase Apli. Clín. 22.4). Otro ejemplo de ello es la apoptosis de las células del timo durante el desarrollo, en el momento en que la corteza suprarrenal inicia su actividad y empieza a sintetizar y secretar cantidades relativamente considerables de cortisol. Un recién nacido posee un gran timo, pero cuando el cortisol comienza a sintetizarse y liberarse, las células corticales del timo empiezan a morir hasta que se llega a un núcleo de células resistentes, con lo que la glándula adquiere su tamaño adulto. Por consiguiente, la muerte celular programada es un mecanismo que se utiliza en el desarrollo para la maduración de algunos órganos, así como en sistemas cíclicos en que las células proliferan para sufrir a continuación una regresión hasta que se inicia un nuevo ciclo y comienza de nuevo la proliferación, como en el caso del ciclo ovárico.

La inducción de la apoptosis por los glucocorticoides en los timocitos se lleva a cabo mediante el receptor intracelular de los glucocorticoides. Existen dos fases en este complejo proceso: la inhibición de la proliferación celular (fase citostática), seguida de una fase citolítica que se caracteriza por la rotura del DNA internucleosómico y en último término la muerte de la célula (fase citolítica). Estas dos fases no están necesariamente ligadas, ya que algunas células, en respuesta a las hormonas glucocorticoides, sufren inhibición del crecimiento, pero no lisis. No se conoce con precisión el mecanismo por el que los complejos glucocorticoide–receptor inducen la muerte celular. La exposición a la hormona podría ocasionar un cambio conformacional en la cromatina que descubriera las regiones del DNA de unión internucleosómica, que son sustratos para una nucleasa. Cuando se tratan timocitos con glucocorticoides se produce la activación de una endonucleasa endógena constitutiva, dependiente de Ca^{2+}/Mg^{2+}. Un tratamiento similar de células T de leucemia humana ocasiona la activación de una nucleasa independiente de Ca^{2+}/Mg^{2+}. En estudios recientes, se ha demostrado que la nucleasa dependiente de Ca^{2+}/Mg^{2+} que es activada por los glucocorticoides en timocitos de rata es homóloga a una ciclofilina. Estas pro-



APLICACIÓN CLÍNICA 22.4
Muerte celular programada en el ciclo ovárico

Durante el ciclo ovárico, el folículo ovárico expele el óvulo maduro en el decimocuarto día y las células restantes del folículo se diferencían dando un cuerpo lúteo funcional. Dicho cuerpo produce algo de estradiol para reemplazar una parte del que proporcionó anteriormente el folículo en estado de maduración. De todas formas, su producto principal es la progesterona. El estradiol y la progesterona son los estimuladores más importantes del aumento en el grosor de la pared endometrial uterina, que se prepara así para la implantación. Una de las proteínas inducidas por la acción del estradiol sobre el endometrio es el receptor de progesterona, por lo que las células endometriales uterinas se hacen sumamente sensibles al estradiol y a la progesterona. El cuerpo lúteo suministra esta última pero, en caso de que no se produzca la fertilización y el desarrollo del embrión, su vida es muy breve y se atrofia por falta de LH o de gonadotropina coriónica, una hormona producida por el zigoto. La producción de oxitocina y de PGF_{2a} en el ovario puede provocar la destrucción del cuerpo lúteo (luteólisis). Los niveles sanguíneos de estradiol y de progesterona descienden mucho después de la luteólisis, y los estimuladores de las células endometriales uterinas desaparecen, hecho que ocasiona la degeneración de esa capa de tejido, engrosada y vascularizada. En ese momento se produce la menstruación. Estas células mueren por muerte celular programada (apoptosis) debido a la desaparición de los esteroides. El hecho más significativo de este proceso es la fragmentación internucleosómica del DNA. De este modo, la muerte celular programada parece desempeñar papeles específicos en el desarrollo y en los ciclos tisulares, ya sea a causa de un estímulo hormonal específico, ya sea a causa de la desaparición de una o varias hormonas.

Erickson, G. F. y Schreiber, J. R. Morphology and physiology of the ovary. En: K. L. Becker (Ed.), *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism.* New York: Lippincott, 1990, p. 776; Rebar, R. W., Kenigsberg, D. y Hogden, G. D. The normal menstrual cycle and the control of ovulation. En: K Becker (Ed.), *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism.* New York: Lippincott, 1990, p. 788; y Hamburger, L., Hahlin, M., Hillensjo, T., Johanson, C. y Sjogren, A. Luteotropic and luteolytic factors regulating human corpus luteum function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 541:485, 1988.

teínas unen con elevada afinidad el fármaco inmunosupresor ciclosporina A, y poseen una actividad nucleasa dependiente de Ca^{2+}/Mg^{2+}. El mecanismo o mecanismos por los que las hormonas glucocorticoides inducen la lisis de los timocitos parece ser diferente al correspondiente a las células T leucémicas también en otros aspectos. El tratamiento de células T sensibles con estas hormonas conduce a la regulación positiva de los niveles de mRNA del receptor de glucorticoides, mientras que un tratamiento idéntico con los timocitos parece conducir a una regulación negativa de los niveles de mRNA. Además, los niveles de mRNA de un importante factor de crecimiento, *c-myc*, están reprimidos en las células T tratadas con glucocorticoides, e inducidos en los timocitos. Así pues, las fases citostática y citolítica de la apoptosis pueden seguir rutas algo diferentes en estos dos tipos de células.

BIBLIOGRAFÍA

Argentin, S., Sun, Y. L., Lihrmann, I., Schmidt, T. J., Drouin, J. y Nemer, M. Distal cis-acting promoter sequences mediate glucocorticoid stimulation of cardiac ANF gene transcription. *J. Biol. Chem.* 266:23315, 1991.

Baulieu, E. E. Steroid hormone antagonists at the receptor level: a role for heat-shock protein MW 90,000 (hsp 90). *J. Cell. Biochem.* 35:161, 1987.

Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335, 1989.

Carson-Jurica, M. A., Schrader, W. T. y O'Malley, B. W. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr. Rev.* 11:201, 1990.

Blumberg, B. y Evans, R. M. Orphan nuclear receptors—new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* 12:3149, 1998.

Chen, J. D. Steroid/nuclear receptor coactivators. En: G. Litwack (Ed.), *Vitamins and Hormones,* Vol. 28. San Diego: Academic Press, 2000, p. 391.

Chrousos, G. P., Loriaux, D. L. y Lipsett, M. B. (Eds.). *Steroid Hormone Resistance.* New York: Plenum Press, 1986.

Drouin, J., Sun, Y. L. Tramblay, S., Schmidt, T. J., deLean A. y Nemer, M. Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 6:1299, 1992.

Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889, 1988.

Giguere, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. y Evans, R. M. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46:645, 1986.

Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W. y Chambon, P. The N-terminal DNA-binding "zinc-finger" of the estrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* 7:3037, 1988.

Gustafsson, J. A., et al. Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocr. Rev.* 8:185, 1987.

Huft, R. W. y Pauerstein, C. J. *Human Reproduction: Physiology and Pathophysiology.* New York: Wiley, 1979.

Litwack, G. (Ed.). *Biochemical Actions of Hormones,* Vols. 1–14. New York: Academic Press, 1973–1987.

Mester, J. y Baulieu, E. E. Nuclear receptor superfamily. En: L. J. DeGroot et al. (Eds), *Endocrinology,* 3rd ed., Philadelphia: Saunders, 1995, p. 93.

Norman, A. W. y Litwack, G. *Hormones,* 2nd ed. Orlando, FL: Academic Press, 1997.

O'Malley, B. W., Tsai, S. Y., Bagchi, M., Weigel, N. L., Schrader, W. T. y Tsai, M. J. Molecular mechanism of action of a steroid hormone receptor. *Recent Prog. Horm. Res.* 47:1, 1991.

Renkawitz, R. Repression mechanisms of v-erbA and other members of the steroid receptor superfamily. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 684:1, 1993.

Rusconi, S. y Yamamoto, K. R. Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6:1309, 1987.

Schmidt, T. J. y Meyer, A. S. Autoregulation of corticosteroid receptors. How, when, where and why? *Receptor* 4:229, 1994.

Schwabe, J. W. R. y Rhodes, D. Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem. Sci.* 16:291, 1991.

Wahli, W. y Martinez, E. Superfamily of steroid nuclear receptors—positive and negative regulators of gene expression. *FASEB J.* 5:2243, 1991.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Entre las hormonas esteroides C-21 se incluyen:
   A. la aldosterona.
   B. la deshidroepiandrosterona.
   C. el estradiol.
   D. la testosterona.
   E. la vitamina D_3.

2. La actividad del complejo enzimático de rotura de la cadena lateral puede estimularse mediante todo lo siguiente, EXCEPTO:
   A. cAMP.
   B. Ca^{2+} liberado a través de la ruta del IP_3.
   C. Ca^{2+} que penetra en la célula a través de un canal.
   D. 5′-AMP.
   E. inducción de la proteína StAR.

3. La Δ^5-pregnenolona es un precursor de las siguientes sustancias EXCEPTO:
   A. aldosterona.
   B. cortisol.
   C. 17β-estradiol.
   D. progesterona.
   E. vitamina D_3.

4. El ácido retinoico y sus derivados:
   A. pueden activar la transcripción génica eliminando la actividad silenciadora de proteínas receptoras.
   B. se unen a proteínas homodiméricas, las cuales a su vez se unen al DNA.
   C. se unen directamente al DNA a través de motivos estructurales de tipo cremallera de leucinas.
   D. son derivados de vitaminas y por tanto no tienen ningún efecto en la regulación de la expresión génica.
   E. pueden sustituir a las hormonas tiroideas en su fijación al receptor de hormonas tiroideas.

Respuestas a que hacen referencia las preguntas 5–8:

   A. globulina de fijación de corticosteroides.
   B. albúmina sérica.
   C. globulina de fijación de hormonas sexuales.

D. proteína de fijación de andrógenos.
E. transferrina.

5. Es el principal portador de aldosterona en la sangre.

6. Suministra testosterona a los espermatozoides.

7. Fija un 75-80% de 17-hidroxiesteroides del plasma.

8. En la pubertad disminuye más en el hombre que en la mujer.

9. ¿El receptor de cuál o cuáles de los siguientes esteroides reconoce un elemento de respuesta del DNA diferente del resto?
   A. los estrógenos.
   B. los glucocorticoides.
   C. los mineralocorticoides.
   D. la progesterona.

10. Todos estos receptores pueden pertenecer a la superfamilia génica de los receptores de esteroides, EXCEPTO:
    A. el receptor de hidrocarburos arílicos.
    B. la proteína *erb*A.
    C. el receptor del ácido retinoico.
    D. el receptor de la hormona tiroidea.
    E. el receptor de α-tocoferol.

Preguntas 11 y 12: la aldosterona unida a su receptor promueve la reabsorción de sodio en el nefrón distal del riñón. Niveles elevados de sodio en la sangre llevan a la hipertensión, que puede ser un serio problema durante el embarazo. Las causas de la hipertensión en el embarazo no se conocen todavía, aunque podrían estar involucrados defectos en el sistema que produce la liberación de aldosterona. En algunos casos, se ha visto que la hipertensión que aparece al principio del embarazo y que va aumentando con el tiempo está producida por una mutación en el receptor de mineralocorticoides. La mutación permite que la progesterona se una con la misma afinidad que la aldosterona y, de este modo, actúa como un agonista. Como los niveles de progesterona son altos durante el embarazo, el receptor mutado permanece saturado y la presión sanguínea puede llegar a ser peligrosamente elevada. La espironolactona, que actúa como antagonista de la aldosterona con un receptor normal, actúa como agonista con el receptor mutado y no debería usarse para tratar este tipo de hipertensión.

11. Todos los siguientes son acontecimientos normales que conducen a la secreción de aldosterona desde la glándula adrenal o que ocurren después de esta secreción, EXCEPTO:
    A. el riñón libera renina cuando existe hipovolemia.
    B. el angiotensinógeno se une a receptores de membrana.
    C. se activa el ciclo del PI y se produce IP_3 y DAG.
    D. se elevan los niveles de Ca^{2+} en la célula.
    E. se secreta aldosterona a la sangre.

12. Una vez se da la ovulación, se sigue una distinta vía según si el huevo se ha fertilizado o no. ¿Cuál o cuáles de las siguientes afirmaciones sobre este proceso son ciertas?
    A. la FSH, a través del cAMP como segundo mensajero, estimula al folículo para que libere 17β-estradiol.
    B. los niveles sanguíneos de progesterona decaen a medida que el embarazo avanza porque el cuerpo lúteo muere.
    C. la inhibina producida por el folículo impide la liberación de LH.
    D. la FSH es la influencia primaria para que el cuerpo lúteo produzca progesterona y estradiol.
    E. todas las anteriores son correctas.

Preguntas 13 y 14: un recién nacido posee un gran timo, pero, cuando la corteza suprarrenal se vuelve funcional, las células del timo empiezan a morir hasta que la glándula alcanza su tamaño adulto. Éste es un ejemplo de la muerte celular programada, denominada apoptosis. La apoptosis puede ser causada o por un aumento o por un descenso de hormonas específicas. En este caso, la apoptosis se origina cuando la corteza suprarrenal sintetiza y secreta cantidades relativamente grandes de cortisol. El complejo cortisol–receptor es responsable de la muerte celular. Aunque el mecanismo exacto no está claro, se ha observado que los timocitos de rata tratados con glucocorticoides presentan activación de una nucleasa dependiente de Ca^{2+}/Mg^{2} que podría cortar el DNA.

13. Los receptores de glucocorticoides se encuentran en el citoplasma. Todas las siguientes afirmaciones acerca del proceso por el cual la hormona influencia la transcripción son correctas, EXCEPTO:
    A. la hormona tiene que estar en el estado libre para cruzar la membrana celular.
    B. los receptores citoplasmáticos pueden estar asociados a proteínas de choque térmico.
    C. el complejo receptor–hormona no se activa/transforma hasta que se transloca hacia el núcleo.
    D. en el núcleo, el complejo receptor–hormona activado/transformado busca secuencias específicas del DNA denominadas HRE (elementos de respuesta a hormona).
    E. el complejo receptor–hormona activado puede o activar o reprimir la transcripción de genes específicos (solamente un tipo de actividad por gen).

14. Otro ejemplo de apoptosis causada por cambios en los niveles hormonales lo encontramos en el ciclo ovárico. Cuando no se da fertilización del óvulo, las células endometriales mueren porque:
    A. los niveles de LH aumentan después de la ovulación.
    B. los niveles de estradiol no están implicados en la rápida subida de LH.
    C. el estradiol inhibe la indución del receptor de progesterona en el endometrio.
    D. la oxitocina y la $PGF_{2\alpha}$ destruyen el endometrio directamente.
    E. la involución del cuerpo lúteo hace que los niveles de estradiol y progesterona desciendan de manera espectacular.

Problemas

15. Los fármacos esteroides antiinflamatorios inhiben la síntesis de prostaglandinas de, al menos, dos modos—inhibición de la fosfolipasa A_2 e inhibición de la ciclooxigenasa. ¿Por qué los fármacos antiinflamatorios de nueva generación denominados inhibidores de COX2 (Celebrex, Vioxx) se toleran mejor que los fármacos anteriores?

16. ¿Cuál es la relación entre el 7-deshidrocolesterol y el 1α,25-dihidroxicolecalciferol?

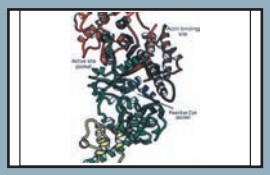
RESPUESTAS

1. **A** Este es un mineralocorticoide. B, D: Estos son andrógenos C-19. C: El estradiol es un estrógeno C-18. E: La vitamina D_3 es un compuesto C-27.

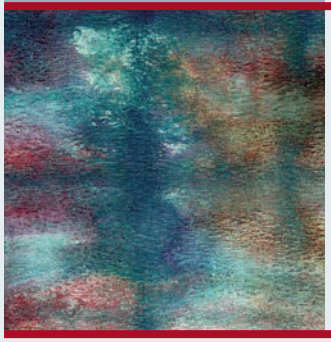
2 **D** Esta es la forma inactiva del cAMP. A–C: El complejo hormona-receptor activa la adenilato ciclasa a través de la proteína G y el canal de calcio. E: La proteína StAR facilita la transferencia de

colesterol hacia la membrana mitocondrial interna, donde se encuentra el P450.

3. **E** La síntesis de la vitamina D_3 tiene lugar a partir de 7-deshidrocolesterol. A–D: la pregnenolona es un intermediario necesario para la síntesis de todas las hormonas esteroides.
4. **A** El receptor del ácido retinoico (RAR) se une a elementos silenciadores específicos en ausencia del ligando, ácido retinoico. Cuando el ácido retinoico está unido, el receptor pierde su actividad silenciadora y activa la transcripción génica. B: Además, existen receptores retinoides X (RXR), que afectan también a la expresión génica, a través de la heterodimerización con RAR. C: El ácido retinoico se une a su receptor. La proteína receptora se puede unir al DNA a través de una cremallera de leucina. E: el receptor de hormonas tiroideas es una proteína distinta al RAR.
5. **B** Un sesenta por ciento se transporta de esta manera.
6. **D** Las células de Sertoli secretan esta proteína en respuesta a testosterona y FSH.
7. **B** La globulina fijadora de corticosteroides tiene una alta afinidad por el cortisol.
8. **C** Como consecuencia, hay más testosterona libre circulando en la sangre de varones adultos.
9. **A** El elemento de respuesta *positiva* de los glucocorticoides es el mismo que el elemento de respuesta de los mineralocorticoides y que el elemento de respuesta de la progesterona. El elemento de respuesta del estrógeno es diferente.
10. **E** B: Téngase en cuenta que el *c-erbA* es un protooncogén.
11. **B** La renina corta el angiotensinógeno, que pasa a angiotensina I, la cual tiene que ser cortada de nuevo por el enzima de conversión para transformarla en angiotensina II activa. A: Ésta es una señal importante. C, D: Éstos conducen a un aumento de Ca^{2+} y activación de la proteína quinasa C.
12. **A** La activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP estimula la síntesis y la secreción de estradiol. B: Esto es lo que ocurre en ausencia de fertilización. En el embarazo, el cuerpo lúteo muere con el tiempo, pero la placenta produce altos niveles de progesterona. C: la inhibina controla la liberación de FSH. D: la LH controla el cuerpo lúteo.
13. **C** La disociación de la proteína de choque térmico del complejo receptor–hormona en el citosol activa el complejo. A: las hormonas esteroides viajan unidas a proteínas plasmáticas, pero una parte está siempre libre. D: Éstas son secuencias consenso del DNA. E: la activación es más común, pero los glucocorticoides reprimen la transcripción del gen de la proopiomelanocortina.
14. **E** El estradiol y la progesterona son los estimuladores principales del engrosamiento del endometrio para la preparación de la implantación del óvulo fertilizado. A: la LH aumenta antes de la ovulación. B: el estrógeno aumenta a mitad del ciclo, la progesterona un poco después, pero esto tendría tendencia a mantener el endometrio. C: el estradiol induce el receptor de la progesterona. D: la oxitocina y el $PGF_{2\alpha}$ están involucrados en la luteólisis (degradación del cuerpo lúteo), así como en la reducción de los niveles de LH.
15 Existen dos ciclooxigenasas. COX1 es un enzima que se expresa constitutivamente y que cataliza la síntesis de prostaglandinas necesarias, por ejemplo, para la protección del revestimiento del estómago y los procesos de coagulación de la sangre. No obstante, COX2 se induce como parte de la respuesta inflamatoria. Los fármacos antiinflamatorios no esteriodes (NSAID: nonsteroidal antiinflamatory drugs) como la aspirina inhiben tanto COX1 como COX2, de modo que la irritación de estómago es común. Los fármacos para COX2 solamente inhiben la producción de prostaglandinas inflamatorias.
16 El 1α,25-dihidroxicolecalciferol (1,25 $(OH)_2D_3$) es la forma activa de la vitamina D. La luz ultravioleta que actúa sobre la piel convierte el 7-deshidrocolesterol en colecalciferol. Este compuesto debe ser hidroxilado en el hígado para dar 25-hidroxicolecalciferol y, a continuación, en el riñón para producir 1,25 $(OH)_2D_3$ activo.



23



BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA

Thomas E. Smith

23.1 VISIÓN GENERAL 990

23.2 TEJIDO NERVIOSO: METABOLISMO Y FUNCIÓN 990

ATP y potencial eléctrico transmembrana en las neuronas 991
La interacción neurona–neurona se produce a través de sinapsis 993
Síntesis, almacenamiento y liberación de neurotransmisores 994
Terminación de la señal en la unión sináptica 998
- Acetilcolina 998
- Catecolaminas 1000
- 5-Hidroxitriptamina (Serotonina) 1001
- γ-Aminobutirato 1001

Los neuropéptidos provienen de proteínas precursoras 1001

23.3 EL OJO: METABOLISMO Y VISIÓN 1002

La córnea obtiene su ATP a partir del metabolismo aeróbico 1003
El cristalino es en su mayor parte agua y proteína 1003
La retina obtiene su ATP a partir de la glucólisis anaeróbica 1005
En el proceso de la transducción visual intervienen fenómenos fotoquímicos, bioquímicos y eléctricos 1006
Las células fotorreceptoras son los bastones y los conos 1007
La visión del color reside en los conos 1013
Otras diferencias físicas y químicas entre conos y bastones 1016

23.4 CONTRACCIÓN MUSCULAR 1016

La contracción del músculo esquelético sigue una ruta eléctrica-química-mecánica 1016
El filamento grueso del músculo es miosina 1018
La actina, la tropomiosina y la troponina son proteínas del filamento delgado 1021
La contracción muscular necesita Ca^{2+} 1025
La hidrólisis del ATP aporta la energía para la contracción muscular 1027
Modelo de contracción del músculo esquelético 1029
El calcio regula la contracción del músculo liso 1030

23.5 MECANISMO DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA 1031

Procesos bioquímicos de la hemostasis 1031
Fase de procoagulación de la hemostasis (Fase 1) 1033
- Ruta extrínseca e inicio de la coagulación 1033
- Formación de trombina 1034
- Reacciones de la ruta intrínseca 1034
- Formación del tapón plaquetario 1039

Fase de anticoagulación de la hemostasis (Fase 2) 1041
- Inhibición de la ruta extrínseca 1041
- Inactivación de FVa y FVIIIa 1043

Fase de fibrinólisis de la hemostasis (Fase 3) 1045
La fibrinólisis necesita plasminógeno y activador de plasminógeno tisular (t-PA) para producir plasmina 1045
Papel de los residuos Gla en los factores de coagulación sanguínea 1045
Papel de la vitamina K en las reacciones de las carboxilasas de proteínas 1047
Control de la síntesis de proteínas con Gla 1049

BIBLIOGRAFÍA 1049

PREGUNTAS 1050

RESPUESTAS 1052

APLICACIONES CLÍNICAS

23.1 Síndrome miasténico de Lambert–Eaton 997
23.2 Miastenia grave: una disfunción neuromuscular 999
23.3 Degeneración de la mácula y otras causas de pérdida de la visión 1006
23.4 Enfermedad de Niemann–Pick y retinitis pigmentosa 1007
23.5 Retinitis pigmentosa como resultado de una mutación en el gen de la periferina 1009
23.6 Localización cromosómica de los genes de la visión 1015
23.7 Cardiomiopatías hipertróficas familiares y mutaciones en las proteínas musculares 1019
23.8 Mutaciones en la actina y cardiomiopatía dilatada 1022
23.9 Subunidades de troponina como marcadores del infarto de miocardio 1024
23.10 Enfermedades relacionadas con los canales iónicos con compuertas de voltaje 1026
23.11 Canales iónicos y enfermedades del músculo cardíaco 1027
23.12 Defectos en la ruta intrínseca: déficit de precalicreína 1034
23.13 Hemofilia clásica 1039
23.14 Trombosis y alteraciones en la ruta de la proteína C 1044

23.1 VISIÓN GENERAL

Los animales conocen su entorno a través de las respuestas de órganos específicos a estímulos: tacto, dolor, calor, frío, intensidad (luz o ruido), color, forma, posición, tono, calidad, ácido, dulce, amargo, salado, alcalino, olor y otros. Externamente, estos estímulos se manifiestan generalmente como respuestas en la piel, el ojo, el oído, la lengua y la nariz. Algunas de estas señales están localizadas en el punto donde se producen, otras —sonido y visión— se proyectan en el espacio, es decir, en el medio exterior y distante del animal.

La discriminación de las señales tiene lugar en el punto de recepción, pero el reconocimiento de lo que son se produce como resultado de una estimulación secundaria del sistema nervioso y de la transmisión de las señales al cerebro. En muchos casos, es indicada una respuesta física que tiene como resultado una actividad muscular, ya sea voluntaria o involuntaria. La actividad eléctrica asociada a la transmisión de señales a lo largo de las neuronas y la actividad química asociada a la transmisión de señal a través de las uniones sinápticas son comunes en estos fenómenos. En todos los casos, el estímulo ambiental recibido en forma de presión (piel, tacto), luz (ojo, visión), ruido (oído, audición), sabor (lengua) u olor (nariz) debe convertirse (transducirse) en un impulso eléctrico y en alguna otra forma de energía para ocasionar la respuesta final deseada ordenada por el cerebro. Hay un componente bioquímico asociado a cada uno de estos procesos.

En este capítulo se tratarán los mecanismos bioquímicos generales de transducción y amplificación de señal en relación con los procesos bioquímicos que intervienen en la transmisión nerviosa, la visión y la contracción muscular. Por último, se abordará un caso especializado de amplificación de señal bioquímica, la coagulación sanguínea. Este último es de hecho la hemostasis con énfasis en los enzimas y proteínas auxiliares que intervienen en las fases del proceso que van desde la coagulación a la fibrinólisis. Un característica común a todos los temas tratados en este capítulo es que los procesos son iniciados por algún estímulo, se propagan y se amplifican mediante algún proceso bioquímico, se terminan y vuelven a disponerse para el siguiente estímulo. La energía y los metabolitos intermedios necesarios para muchos de estos procesos pueden mencionarse brevemente en este capítulo, ya que se cubren con suficiente detalle en otras partes del libro.

23.2 TEJIDO NERVIOSO: METABOLISMO Y FUNCIÓN

El conocimiento de la composición química del cerebro empieza con el trabajo de J. L. W. Thudichum, en 1884, y la publicación de su monografía "Tratado de la composición química del cerebro, basado en investigación original" (citado en West y Todd, *Textbook of Biochemistry*, MacMillan, 1957). La investigación de Thudichum se amplió gracias al trabajo de otros investigadores en esa época temprana. Avances casi explosivos, en épocas más recientes, han tenido lugar gracias a las técnicas de biología molecular, no sólo en relación con la composición del cerebro, sino también de los mecanismos moleculares implicados en muchas de las funciones cerebrales y neuronales.

Alrededor de un 2,4% del peso corporal de un adulto corresponde a tejido nervioso, del cual aproximadamente un 83% se encuentra en el cerebro. El sistema nervioso proporciona la red de comunicaciones entre los sentidos, el medio exterior y todas las partes del cuerpo. El cerebro es el centro de mando. Este sistema siempre está en funcionamiento y necesita una gran cantidad de energía para mantenerse operativo. En condiciones normales, el cerebro obtiene su energía a partir del metabolismo de la glucosa. Los cuerpos cetónicos pueden atravesar la barrera hematoencefálica y ser metabolizados por el tejido cerebral. El metabolismo de estas sustancias es más importante durante la **inanición**, pero incluso en estas condiciones no pueden sustituir completamente la necesidad de glucosa. El cerebro humano utiliza aproximadamente 103 g de glucosa por día. Para un cerebro de 1,4 kg, esto corresponde a una tasa de utilización aproximada de 0,3 μmol min^{-1} g^{-1} de tejido. Esta velocidad de utilización de la glucosa se corresponde con una capacidad de producción de ATP, solamente a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), de aproximadamente 6,8 μmol min^{-1} g^{-1} de tejido. Por supuesto, ni la eficiencia del ciclo de los TCA para la producción de ATP es del 100%, ni toda la glucosa se metaboliza a través de este ciclo. La mayor parte del ATP utilizado por el cerebro y

otros tejidos nerviosos se genera aeróbicamente a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que trabaja casi al máximo de capacidad. La glucólisis funciona aproximadamente al 20% de su capacidad. Gran parte de la energía utilizada por el cerebro sirve para mantener los gradientes iónicos a través de las membranas plasmáticas, así como para llevar a cabo diversos procesos de transporte y almacenamiento y para la síntesis de neurotransmisores y otros componentes celulares.

Es importante destacar dos características en la composición del cerebro. Contiene lípidos complejos y especializados, cuya función parece ser la de mantener la integridad de la membrana más que la de desempeñar un papel metabólico. Las proteínas del cerebro presentan generalmente una **velocidad de recambio** rápida en relación con otras proteínas del cuerpo, a pesar de que las células neuronales en general no se dividen tras haberse diferenciado.

Las células del sistema nervioso responsables de captar y transmitir mensajes son las **neuronas**, que son células muy especializadas (Figura 23.1). Cada neurona consta de un cuerpo celular, de las **dendritas**, que son protuberancias a modo de antenas cortas cuya función es recibir señales de otras células, y de un **axón**, que se extiende a partir del cuerpo celular y que sirve para transmitir señales a otras células. El sistema nervioso central (SNC) es un sistema muy integrado en el que las neuronas individuales pueden recibir señales procedentes de un gran número de fuentes distintas, que incluyen tanto estímulos inhibidores como excitadores.

En el sistema nervioso central (SNC) existen otras células además de las neuronas. En el cerebro se encuentra una cantidad unas 10 veces superior de células gliales que de neuronas. Las células gliales ocupan los espacios interneuronales y proporcionan cierto aislamiento eléctrico. Las células gliales no son, en general, eléctricamente activas, pero son capaces de dividirse. Básicamente existen cinco tipos de células gliales: células de Schwann, oligodendrocitos, microglía, células ependimales y astrocitos. Cada uno de los tipos de células gliales cumple una función especializada, pero sólo los astrocitos parecen estar directamente asociados con funciones bioquímicas implicadas en la actividad neuronal. Una de sus funciones es metabólica (más adelante se trata el GABA, p. 1001), y la otra es anatómica.

Los astrocitos envían protuberancias hasta las superficies externas del sistema nervioso central. Estas protuberancias están entrelazadas formando complejos anatómicos que dan lugar a barreras cerradas, y aíslan el SNC del medio externo. Los **astrocitos** también envían protuberancias similares hasta el sistema circulatorio, induciendo el sellado de las células endoteliales de los capilares mediante la formación de uniones cementadas que impiden la entrada pasiva en el cerebro de moléculas hidrosolubles. Estas uniones cementadas se conocen normalmente como **barrera hematoencefálica**. Los compuestos hidrosolubles entran en el cerebro sólo si existen sistemas de transporte de membrana específicos para ellos.

Un adulto normal tiene entre 10^{11} y 10^{13} neuronas, y la comunicación entre ellas se lleva a cabo mediante señales eléctricas y químicas. Las señales eléctricas transmiten el impulso nervioso a lo largo del axón, y las señales químicas transmiten la señal a través del espacio intercelular. Se tratará alguno de los fenómenos bioquímicos que proporcionan a la célula sus propiedades eléctricas y que intervienen en la propagación de un impulso.

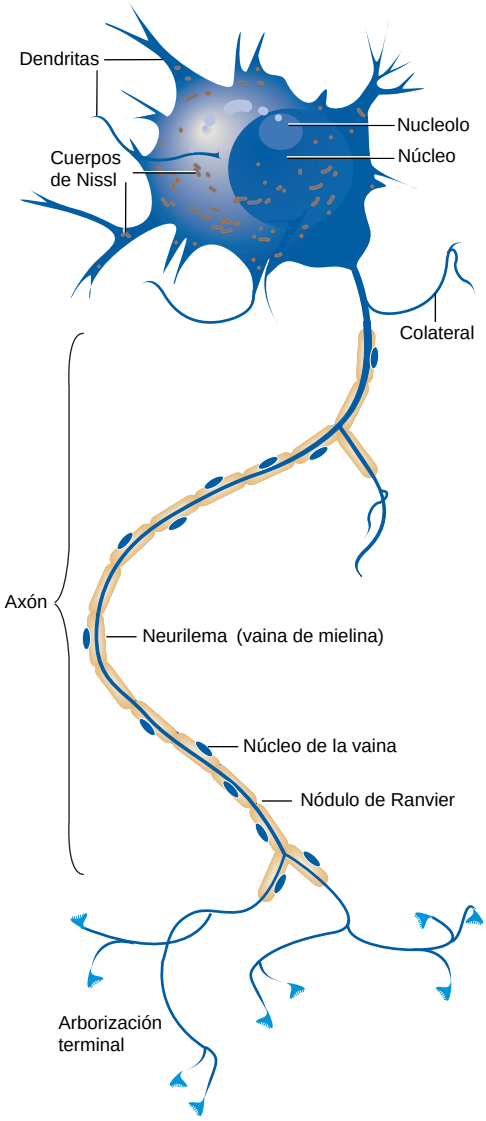
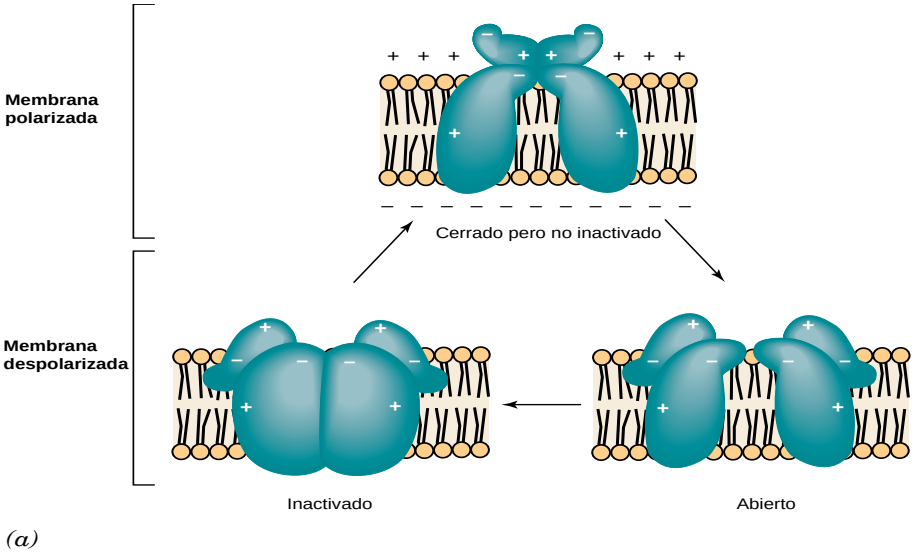


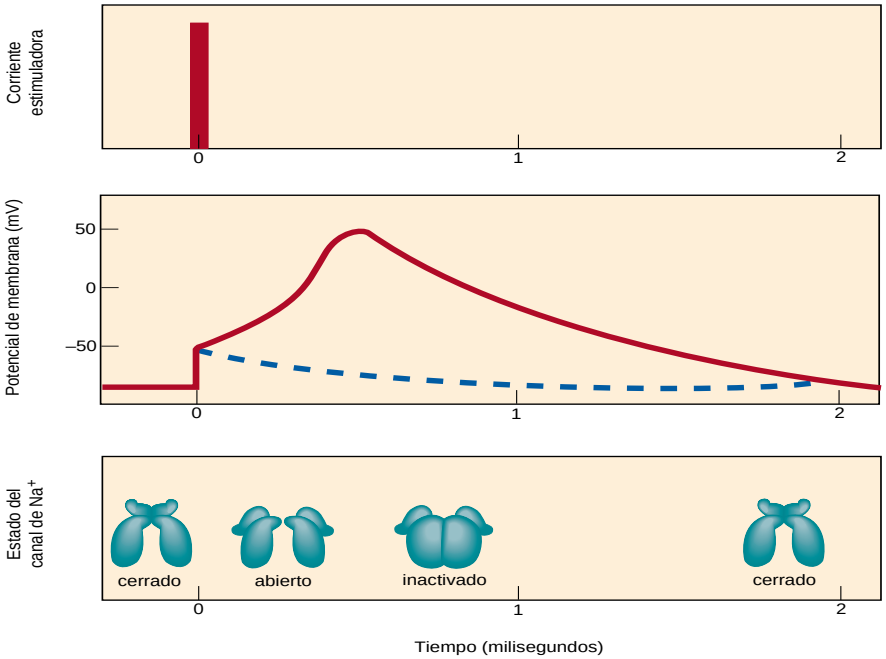
FIGURA 23.1
Célula nerviosa motora y membranas de recubrimiento.

ATP y potencial eléctrico transmembrana en las neuronas

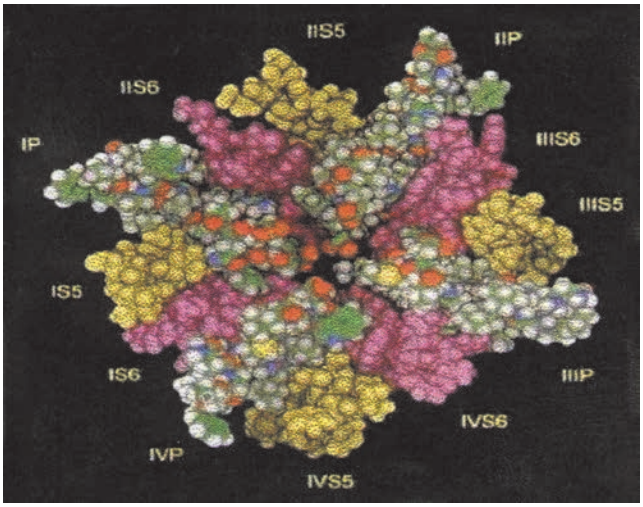
La adenosina trifosfato generada en el metabolismo de la glucosa se utiliza para mantener un potencial eléctrico de equilibrio de –70 mV aproximadamente a través de la membrana de la neurona, siendo el interior de la célula más negativo que el exterior. Este potencial se mantiene por la acción de la **ATPasa intercambiadora de Na^+/K^+** (véase p. 522), cuya energía se obtiene de la hidrólisis del ATP que da ADP y fosfato inorgánico. Este sistema bombea Na^+ hacia el exterior de la célula, en un mecanismo antiparalelo en el que el K^+ se transporta hacia el interior de la célula. Los canales a través de los que el Na^+ penetra en la célula tienen compuertas de voltaje, es decir, las proteínas del canal experimentan un cambio de conformación dependiente de carga que abre el canal cuando el potencial eléctrico a través de la membrana disminuye (específicamente, se vuelve menos negativo) en un valor superior a un valor umbral determinado. Cuando la membrana se despolariza, el Na^+, cuya concentración es mayor en el exterior que en el interior de la célula, fluye hacia el interior, y el K^+, cuya concentración es mayor en el interior de la célula, fluye hacia el exterior de la misma, yendo en ambos casos a favor de sus gradientes de concentración respectivos. Los canales se abren en una región particular de la membrana celular sólo durante



(a)



(b)



(c)

FIGURA 23.2
Canales de Na^+.
Esquemas (*a*, *b*) de la apertura y cierre de los canales de Na^+ durante la transmisión del impulso nervioso. (*c*) Modelo molecular del poro de un canal de Na^+. Esta vista corresponde a la sección en embudo del poro vista desde arriba. Las anotaciones que terminan en S5 y S6 designan estructuras helicoidales y las terminadas en P designan lazos.
Partes (a) y (b) adaptadas de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. Molecular Biology of the Cell, *2d ed. New York: Garland Publishing, 1989, p. 1071; parte (c) reproducida con permiso de Lipkin, G. M. y Fozzard, H. A.* Biochemistry *39:8161, 2000.* Copyright (2000) American Chemical Society.

fracciones de milisegundos (Figura 23.2). La despolarización localizada (cambio de voltaje) provoca un cambio conformacional en las proteínas vecinas que forman los **canales iónicos con compuertas de voltaje**. Estos canales se abren momentáneamente para permitir el paso de más iones hacia el interior y, por lo tanto, al afectar a las proteínas del canal adyacente, permiten que el proceso se propague a lo largo del axón. Existe un tiempo de recuperación limitado durante el cual las proteínas que forman el canal no pueden repetir el proceso de apertura. Por consiguiente, la propagación de la carga discurre en una sola dirección. La despolarización y repolarización progresivas a lo largo del axón son las que permiten la propagación del impulso eléctrico sin disminución de amplitud. En el tejido nervioso, la transmisión del impulso eléctrico es un proceso continuo, siendo el ATP generado principalmente a partir del metabolismo de la glucosa el que mantiene funcional el sistema.

Hasta la fecha, solamente se ha determinado la estructura 3-D de un canal de potasio con compuerta de voltaje de una especie bacteriana. Utilizando esta información y el hecho de que los canales de Na^+, K^+ y Ca^{2+} poseen notables similitudes, se ha desarrollado un modelo para el canal de Na^+, que se muestra en la Figura 23.2*c*. Mutaciones en puntos críticos de estas estructuras pueden conducir a enfermedades.

TABLA 23.1 Algunos neurotransmisores del tejido nervioso

EXCITADORES
Acetilcolina
Aspartato
Dopamina
Histamina
Noradrenalina
Adrenalina
Glutamato
5-Hidroxitriptamina
INHIBIDORES
4-Aminobutirato
Glicina
Taurina

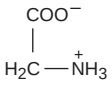
La interacción neurona–neurona se produce a través de sinapsis

Existen dos mecanismos para la interacción neurona–neurona: la **sinapsis eléctrica** y la **sinapsis química**. Las sinapsis eléctricas permiten la transferencia más rápida de señales entre células. Las sinapsis químicas permiten varios niveles de versatilidad en la comunicación intercelular. T. R. Elliot, en 1904, fue uno de los primeros científicos que expresó claramente la idea de que la señalización entre los nervios podía ser de naturaleza química (citado en Fried, 1995). Actualmente se dispone de mucha más información acerca de este tipo de comunicación neurona-neurona. El premio Nobel de Fisiología y Medicina del 2000 se concedió a la investigación en este tema y áreas relacionadas. Las sinapsis químicas son de dos tipos: aquellas en las que el neurotransmisor se une directamente a un canal iónico y provoca que éste se abra o se cierre, y aquellas en las que el neurotransmisor se une a un receptor que libera o conduce a la generación de un segundo mensajero, que reacciona a su vez con un canal iónico, provocando que éste se abra o se cierre. Se tratará aquí con mayor profundidad la sinapsis química.

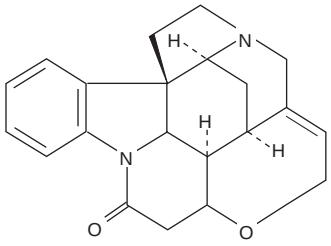
Los neurotransmisores químicos poseen las siguientes propiedades: (1) se encuentran en el terminal presináptico del axón; (2) los enzimas necesarios para su síntesis se encuentran en la neurona presináptica; (3) la estimulación en condiciones fisiológicas da lugar a su liberación; (4) existen mecanismos (dentro de la unión sináptica) para la interrupción rápida de su acción; (5) su aplicación directa al terminal postsináptico imita la acción de la estimulación nerviosa; y (6) los fármacos que modifican el metabolismo del neurotransmisor han de tener un efecto fisiológico predecible *in vivo*, suponiendo que los fármacos se transportan al sitio adecuado en el que actúa el neurotransmisor.

Los neurotransmisores químicos pueden ser excitadores o inhibidores. Algunos **neurotransmisores excitadores** son compuestos tales como la acetilcolina y las catecolaminas. Algunos **neurotransmisores inhibidores** son compuestos tales como el **ácido γ-aminobutírico** (**GABA** o ácido 4-aminobutírico), la glicina y la taurina (Tabla 23.1). En el sistema nervioso central, los dos principales neurotransmisores inhibidores son la glicina, que actúa predominantemente en la médula espinal y en el tronco cerebral, y el GABA, que actúa predominantemente en todas las otras partes del cerebro. La **estricnina** (Figura 23.3), un alcaloide muy venenoso que se obtiene de la nuez vómica y de las plantas relacionadas del género *Strychnos*, se une a los **receptores de glicina** del SNC. Se ha utilizado en dosis muy pequeñas como estimulante del SNC. ¿Puede usted hacer una proposición sobre el modo en que actúa? El **receptor del GABA** también reacciona con varios compuestos farmacológicamente importantes tales como las **benzodiazepinas** (Figura 23.4) y los barbituratos. Al igual que con la estricnina y la glicina, existe poca similitud estructural entre el GABA y las benzodiazepinas.

Se han clonado los genes del **receptor nicotínico de acetilcolina** (véase p. 518), del receptor de glicina y del receptor de GABA, y se han deducido sus secuencias de aminoácidos. Entre las secuencias primarias de aminoácidos de estas proteínas existe un grado de homología relativamente elevado.

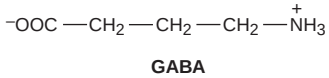


Glicina

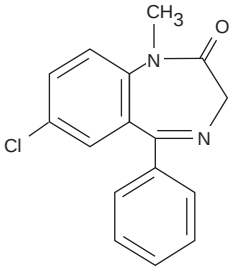


Estricnina

FIGURA 23.3
Estructuras de la glicina y la estricnina.



GABA



Diazepam

FIGURA 23.4
Estructuras del GABA y el diazepam.

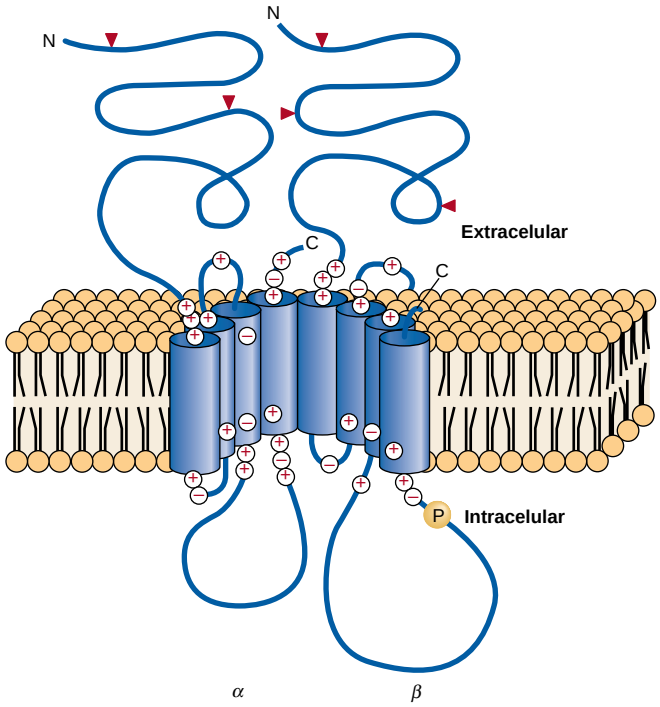


FIGURA 23.5
Modelo esquemático de una mitad del receptor del GABA incrustado en la membrana celular.
El receptor completo forma un canal iónico de estructura $\alpha_2\beta_2$. La P indica un residuo de serina que puede ser fosforilado por una proteína quinasa dependiente de cAMP
Adaptado de Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., et al. Nature *328:221, 1987.*

En la Figura 23.5 se muestra un modelo de una mitad del receptor de GABA. Este receptor tiene una composición $\alpha_2\beta_2$. Los polipéptidos se sintetizan con "péptidos señal" que dirigen su transporte hasta la membrana. La subunidad α tiene 456 aminoácidos, y la subunidad β tiene 474. Los péptidos señal se cortan, liberándose las subunidades α y β de 429 y 449 aminoácidos, respectivamente. Resulta interesante que los agentes farmacológicos se unan a la subunidad α, mientras que el GABA, el neurotransmisor inhibidor natural, se une a la subunidad β. La protuberancia de un largo fragmento del extremo amino terminal de cada polipéptido hacia el lado extracelular de la membrana sugiere que los residuos a los que se unen los reguladores del canal se encuentran en el extremo N-terminal. En el lado extracelular de la membrana también se encuentra un segmento C-terminal más pequeño. Las cuatro subunidades del receptor forman un canal a través del cual pueden pasar los iones negativos pequeños (Cl^-), en función de lo que esté unido al extremo receptor de la molécula.

Todos los neurotransmisores se sintetizan y se almacenan en las **neuronas presinápticas**. Después de la estimulación de la neurona, son liberados, atraviesan la sinapsis y se unen a un receptor específico en la unión postsináptica para desencadenar una respuesta en la siguiente célula. Si el neurotransmisor es excitador, provoca una despolarización de la membrana, tal como se ha descrito anteriormente. Si es un neurotransmisor inhibidor, se une a un receptor vinculado a un canal y provoca un cambio de conformación que abre el poro para permitir la entrada de pequeños iones cargados negativamente, concretamente Cl^-. El efecto neto de todo ello es aumentar la conductancia de cloruros de la membrana postsináptica, haciendo más difícil que se despolarice la célula; es decir, que el transmisor inhibidor produce **hiperpolarización** de manera efectiva.

Síntesis, almacenamiento y liberación de neurotransmisores

Los neurotransmisores no peptídicos pueden sintetizarse en prácticamente cualquier parte de la neurona, en el citoplasma cerca del núcleo, así como en el axón. La mayoría de los neurotransmisores no peptídicos son aminoácidos o derivados de aminoácidos.

Los neurotransmisores viajan rápidamente a través de la **unión sináptica** (de unos 20 nm de grosor), se unen a los receptores del lado postsináptico, inducen cambios conformacionales en los receptores o en la membrana de la neurona postsináptica e inician el proceso de propagación del impulso eléctrico. El almacena-

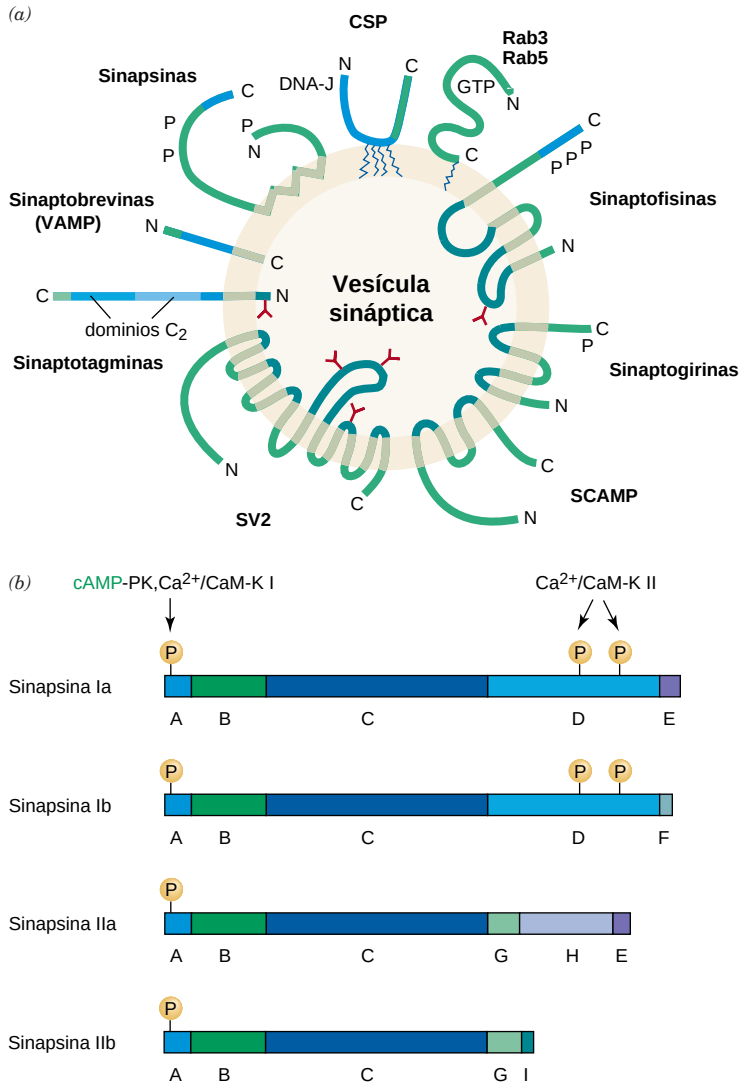


FIGURA 23.6
Vesícula sináptica y familia de proteínas sinapsinas. (*a*) Esquema de la disposición relativa de las proteínas de la vesícula sináptica (SV). Las proteínas Rab están unidas a las SV mediante grupos isoprenilo y las proteínas con ristras de cisteínas mediante cadenas palmitilo. Los extremos N- y C-terminal de las proteínas se indican con las letras N y C, respectivamente. Los sitios de fosforilación se indican con una P. (*b*) Patrón estructural de la familia de proteínas sinapsinas.
Parte (a) adaptado de Sudhof, T. C. Nature *375:645, 1995; parte (b) adaptado del trabajo de Chilcote, T. J., Siow, Y. L., Scaeffer, E., et al.* J. Neurochem. *63:1568, 1994.*

miento y la liberación de los neurotransmisores son procesos complejos, aunque ya se han empezado a dilucidar muchos detalles de estos procesos. Se ha demostrado, mediante técnicas convencionales, que algunas neuronas contienen más de una clase química de neurotransmisor. La importancia de esta observación no está clara. La liberación de un neurotransmisor es un fenómeno cuántico, es decir, un impulso nervioso que llega a una terminación presináptica da lugar a la liberación de neurotransmisores procedentes de un número determinado de **vesículas sinápticas**. La liberación de neurotransmisores implica la fusión de la vesícula sináptica a la membrana y la **exocitosis** de su contenido hacia la hendidura sináptica.

El almacenamiento de neurotransmisores se produce en vesículas de tamaño grande o pequeño, en la terminal presináptica. Las vesículas pequeñas son predominantes y se encuentran en dos reservas: libres y unidas a proteínas del citoesqueleto, principalmente actina. Las vesículas pequeñas contienen solamente moléculas pequeñas, los transmisores "clásicos". En la Figura 23.6*a* se muestra un diagrama esquemático de una vesícula sináptica pequeña. Las vesículas grandes pueden contener pequeñas moléculas neurotransmisoras "clásicas" y neuropéptidos. Algunas pueden también contener enzimas para sintetizar noradrenalina a partir de la dopamina. En la Tabla 23.2 se muestra una lista de algunas de las proteínas de las vesículas grandes. La sinapsina (Figura 23.6*b*) tiene un papel destacado en la regulación de la actividad de estas vesículas. En la Figura 23.7 se muestra un esquema de cómo algunas de estas proteínas pueden estar organizadas en la vesícula sináptica y de cómo pueden interaccionar con la membrana plasmática de la neurona presináptica.

TABLA 23.2 Listado de proteínas de la vesícula sináptica

Sinapsina	Ia
	Ib
	IIa
	IIb
Sinaptofisina	
Sinaptotagmina	
Sintaxina	
Sinaptobrevina/VAMP	
Rab3 y rabifilina	
SV-2	
Bomba vacuolar de protones	

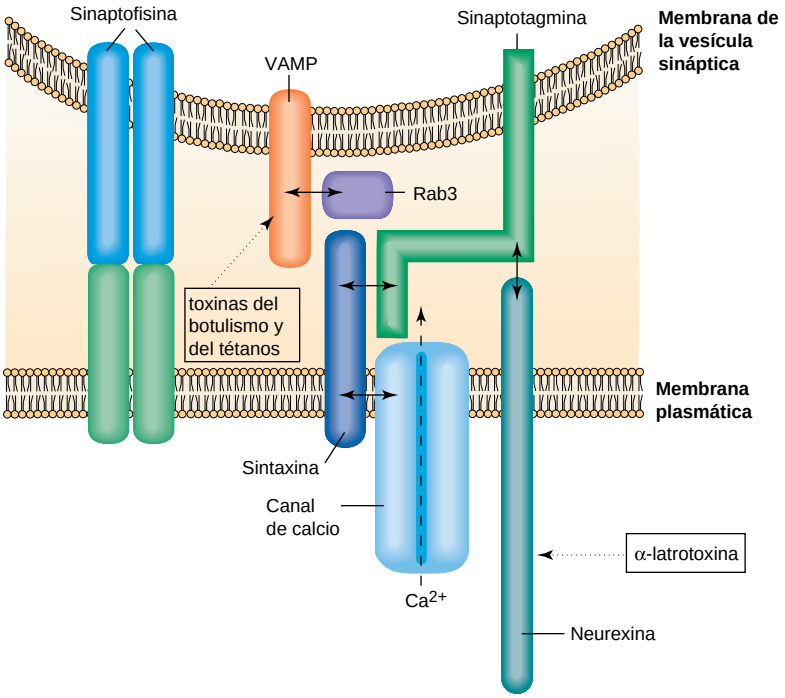


FIGURA 23.7
Esquema que muestra cómo algunas de las proteínas de la vesícula sináptica pueden interaccionar con las proteínas de la membrana plasmática.
Adaptado de Bennett, M. K. y Scheller, R. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90:2559, 1993.*

1. La **sinapsina** es una familia de proteínas codificadas por dos genes, que se diferencian principalmente en el extremo C-terminal (Figura 23.6*b*). Las sinapsinas constituyen alrededor del 9% de la proteína total de la membrana de las vesículas sinápticas. Todas ellas pueden ser fosforiladas cerca de su extremo N-terminal por una **proteína quinasa dependiente de cAMP** o por la **calcio–calmodulina (CaM) quinasa I.** Las sinapsinas Ia y Ib pueden también ser fosforiladas por la **CaM quinasa II** cerca del extremo C-terminal, región ausente en las sinapsinas IIa y IIb.

La sinapsina juega un papel principal en la determinación de si las vesículas sinápticas se encuentran libres y están disponibles para unirse a la membrana presináptica (Figura 23.8). Las vesículas sinápticas existen en la neurona presináptica bien en estado libre o unidas a las proteínas del citoesqueleto. La estimulación ner-

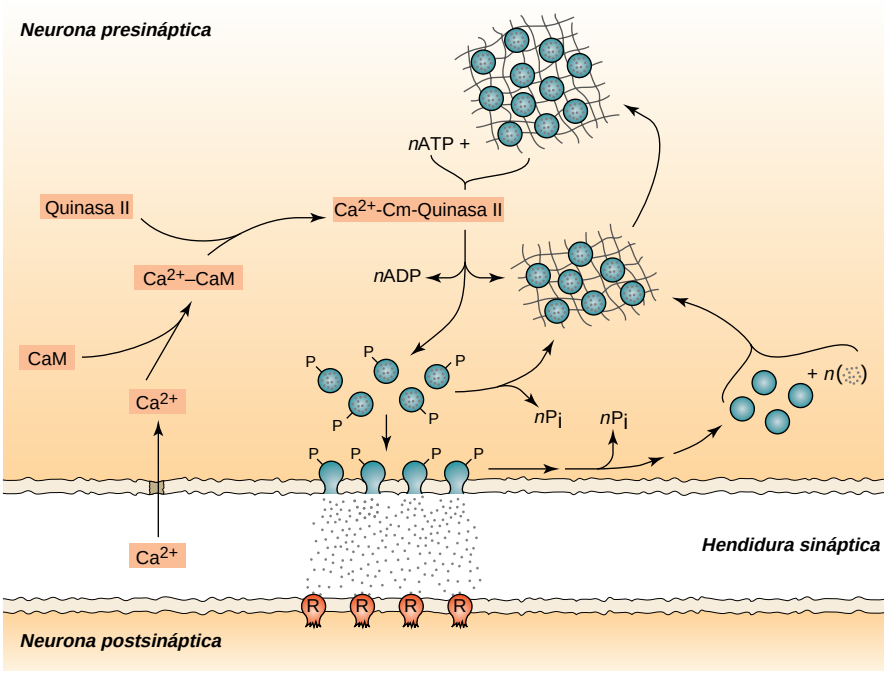


FIGURA 23.8
Modelo del mecanismo por el que los iones de calcio y la calmodulina quinasa II regulan la función de las vesículas sinápticas.
Los círculos verdes dentro de la malla del esqueleto representan vesículas sinápticas unidas, no fosforiladas. La sinapsina en las vesículas con una P han sido fosforiladas y están en la reserva libre. Algunas de ellas pueden unirse a la membrana presináptica y liberar neurotransmisores a la hendidura sináptica. Los neurotransmisores liberados pueden reaccionar con receptores (en rojo) en la membrana postsináptica. Se muestra también esquemáticamente el proceso de recuperación de las vesículas sinápticas y de reempaquetado.

viosa conduce a la entrada de Ca^{2+} en la neurona presináptica (véase Apli. Clín. 23.1). Las Ca^{2+}–CaM quinasas I y II se activan y fosforilan la sinapsina. Ello evita la unión de las vesículas sinápticas a las proteínas del citoesqueleto o las libera de estos sitios de unión. El resultado es un incremento de la reserva libre de vesículas sinápticas. La **calcio–calmodulina** (véase p. 524) puede unirse a la sinapsina y bloquear de forma competitiva su interacción con la actina y presumiblemente con otras proteínas del citoesqueleto. Por consiguiente, la calcio–calmodulina regula el número de vesículas sinápticas que se encuentran libres o unidas.

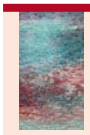
2. La **sinaptofisina** es una proteína integral de membrana de las vesículas sinápticas, cuya estructura es similar a las proteínas de las uniones en hendidura. Puede intervenir en la formación de un canal desde la vesícula sináptica que atraviese la membrana presináptica y que permita el paso de los neurotransmisores hacia la hendidura sináptica.

3. La **sinaptotagmina** es también una proteína integral de la membrana de la vesícula sináptica que interacciona con proteínas específicas localizadas en la membrana plasmática presináptica, de un modo dependiente de Ca^{2+}. Probablemente interviene en el proceso de anclaje de las vesículas sinápticas a la membrana.

4. La **sintaxina** es una proteína integral de membrana que se encuentra en la membrana plasmática de la neurona presináptica. La sintaxina se une a la sinaptotagmina y hace de intermediaria en su interacción con los canales de Ca^{2+} en el sitio de liberación de los neurotransmisores. Parece que también desempeña un papel en la exocitosis.

5. La **sinaptobrevina/VAMP** (o proteína de membrana asociada a vesículas) es una familia de dos pequeñas proteínas de 18 y 17 kDa. Están ancladas en la cara citoplasmática de la membrana mediante un único dominio C-terminal y parece que intervienen en el **transporte de vesículas** o en la exocitosis. Se cree que las VAMP intervienen en la liberación de vesículas sinápticas desde la membrana plasmática de la neurona presináptica. Las **toxinas tetánica** y **botulínica** se unen a las VAMP, originando una inhibición lenta e irreversible de la liberación de transmisores.

6. La **Rab3** es un miembro de la gran familia rab de **proteínas de unión a GTP**. La Rab3 es específica de las vesículas sinápticas e interviene en el anclaje y en el proceso de fusión de la exocitosis. La Rab3 se ancla a la membrana mediante una cadena lateral poliprenilo cercana a su extremo C-terminal. La eliminación, mediante ingeniería genética, del lugar de unión en la cadena lateral poliprenilo no altera su función *in vitro*, pero no está claro si ello se cumple también *in vivo*.



APLICACIÓN CLÍNICA 23.1
Síndrome miasténico de Lambert–Eaton

El síndrome miasténico de Lambert–Eaton (LEMS) es una enfermedad autoinmune en la que el organismo crea anticuerpos contra los canales de calcio con compuerta de voltaje (VGCC), localizados en las terminaciones nerviosas presinápticas. Por una despolarización de las neuronas presinápticas, los canales de calcio situados en su terminación se abren, permitiendo así la entrada de Ca^{2+}. El aumento de concentración de Ca^{2+} desencadena fenómenos del ciclo de la sinapsina y conduce a la liberación de neurotransmisores a las hendiduras sinápticas. Cuando los autoanticuerpos contra los VGCC reaccionan con las neuronas de las conexiones neuromusculares, no puede entrar el Ca^{2+}, y la cantidad de acetilcolina liberada en la hendidura sináptica se ve disminuida. Dado que en el músculo no se pueden inducir los potenciales de acción, los efectos imitan los de la miastenia grave clásica.

El LEMS se ha observado junto a otras enfermedades como el cáncer de pulmón de células pequeñas. Algunos pacientes presentan una alteración neurológica que se manifiesta como una degeneración subaguda del cerebelo (SCD). El recambio plasmático (eliminación de los anticuerpos) y los tratamientos inmunodepresores se han mostrado efectivos ante el LEMS, si bien este último tratamiento es menos efectivo en la SCD.

Las pruebas para diagnosticar el LEMS se basan en la detección de anticuerpos contra los VGCC en los sueros de los pacientes. Existen como mínimo cuatro subtipos de VGCC: T, L, N y P. Se ha visto que el subtipo P puede ser el responsable de iniciar la liberación de neurotransmisores en las conexiones neuromusculares de los mamíferos. Una toxina peptídica sintetizada por un caracol (*Conus magnus*) se une al VGCC de tipo P en extractos de cerebelo. Este pequeño péptido ha sido marcado con ^{125}I, unido a VGCC en extractos de cerebelo, y se ha precipitado el complejo radiactivo con suero de pacientes que se han mostrado clínica y electrofisiológicamente positivos al LEMS. Esta prueba puede ser útil, no sólo para detectar el LEMS, sino también para proporcionar más conocimientos acerca de la antigenicidad del área o áreas del VGCC contra las cuales se han creado los anticuerpos.

Goldstein, J. M., Waxman, S. G., Vollmer, T. L., et al. Subacute cerebellar degeneration and Lambert–Eaton myasthenic syndrome associated with antibodies to voltage-gated calcium channels: differential effect of immunosuppressive therapy on central and peripheral defects. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57:1138, 1994; y Motomura, M., Johnston, I., Lang, B., et al. An improved diagnostic assay for Lambert–Eaton myasthenic syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 58:85, 1995.

7. La **SV-2** es una glucoproteína de gran tamaño con 12 dominios transmembrana. Su función no está clara.

8. La **bomba vacuolar de protones** es una ATPasa de membrana responsable del transporte de neurotransmisores al interior de la vesícula sináptica.

Terminación de la señal en la unión sináptica

La acción del neurotransmisor puede finalizar mediante el metabolismo, la recaptación o la difusión hacia otros tipos celulares. Los neurotransmisores responsables de respuestas rápidas se inactivan generalmente mediante uno de los dos primeros mecanismos, o por ambos a la vez. Las secciones siguientes resumen alguna de las rutas implicadas en la síntesis y degradación de neurotransmisores representativos del grupo de acción rápida, concretamente acetilcolina, catecolaminas, 5-hidroxitriptamina y γ-aminobutirato (GABA).

Acetilcolina

En la Figura 23.9 se presentan las reacciones en las que interviene la **acetilcolina** en la sinapsis. La acetilcolina se sintetiza por la condensación de colina y acetil CoA catalizada por la **colina acetiltransferasa** en el citosol de las neuronas. La reacción es:

$$\underset{\text{Colina}}{(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2OH} + CH_3CO{-}SCoA \longrightarrow \underset{\text{Acetilcolina}}{(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2OCOCH_3} + CoASH$$

La colina se obtiene principalmente de la dieta; sin embargo, una parte de la misma puede proceder de su reabsorción desde la unión sináptica o de otras fuentes metabólicas (véase p. 794). La fuente principal de acetil CoA es la descarboxilación del piruvato por el complejo piruvato deshidrogenasa mitocondrial. Dado que la colina acetiltransferasa se encuentra en el citosol, el acetil CoA debe entrar en éste para que tenga lugar la reacción. En la neurona presináptica funciona el mismo mecanismo descrito anteriormente (véase p. 703) para obtener acetil CoA a través de la membrana mitocondrial interna (en forma de citrato).

La acetilcolina se libera y reacciona con el receptor nicotínico de la acetilcolina situado en la membrana postsináptica (véase Apli. Clín. 23.2). La acción de la ace-

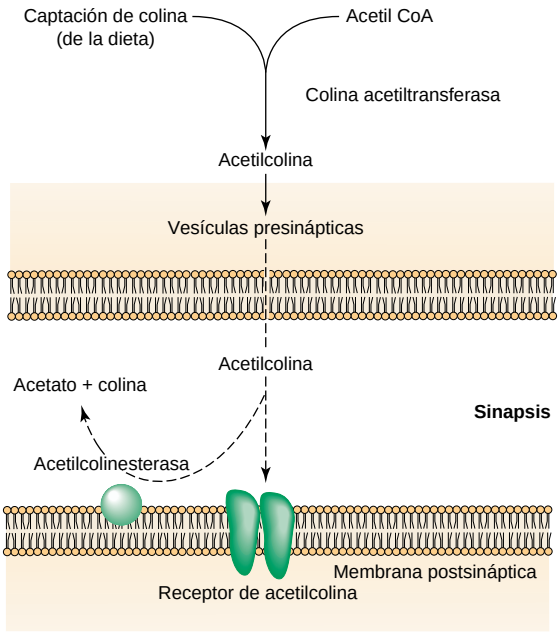
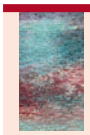


FIGURA 23.9
Resumen de las reacciones de la acetilcolina en la sinapsis.
Acetil CoA, acetilcoenzima A.



APLICACIÓN CLÍNICA 23.2
Miastenia grave: una disfunción neuromuscular

La miastenia grave es una enfermedad autoinmune adquirida caracterizada por debilidad muscular debida a una disminución de la transmisión de la señal neuromuscular. El neurotransmisor involucrado es la acetilcolina. Más del 90% de los pacientes con miastenia grave presentan en su suero sanguíneo anticuerpos contra el receptor nicotínico de la acetilcolina (AChR), que se encuentra en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular. Los anticuerpos contra el AChR interaccionan con el receptor e inhiben su función, ya sea la capacidad de unir acetilcolina o la de sufrir los cambios de conformación necesarios para llevar a cabo el transporte de iones. Pruebas que apoyan que la miastenia grave es una enfermedad autoinmune que afecta al AChR son el hallazgo de que la cantidad de AChR disminuye en pacientes con esta enfermedad, y el hecho de que se han obtenido modelos experimentales de miastenia grave, tanto inmunizando animales con AChR como inyectándoles anticuerpos contra éste.

No se sabe qué mecanismos desencadenan la enfermedad. Existen antígenos medioambientales que presentan epítopos similares a los del AChR. Un anticuerpo monoclonal de rata del tipo IgM preparado contra el AChR reacciona también con dos proteínas procedentes de la bacteria intestinal *E. coli*. Ambas proteínas son proteínas de membrana de 38 y 55 kDa, la menor de las cuales se localiza en la membrana externa. Sin embargo, esto no sugiere que la exposición a proteínas de *E. coli*. sea el desencadenante de la enfermedad. El suero de individuos normales y de pacientes con miastenia grave contiene anticuerpos contra un gran número de proteínas de *E. coli*. Algunos antígenos medioambientales procedentes de otras fuentes también reaccionan con los anticuerpos contra AChR.

La glándula del timo, involucrada en la producción de anticuerpos, también está relacionada con esta enfermedad. Anticuerpos encontrados en la glándula del timo de pacientes con miastenia grave reaccionan con el AChR, y en algunos casos con antígenos medioambientales. La relación entre antígenos medioambientales, anticuerpos del timo contra el AChR y la aparición de la miastenia grave no está clara.

Los pacientes con miastenia grave pueden someterse a una terapia o a una combinación de varias terapias. Se ha utilizado el bromuro de piridostigmina, inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa (AChE), que no atraviesa la barrera hematoencefálica. La inhibición por este tipo de fármacos de la AChE en la sinapsis aumenta la vida media de la hidrólisis de la acetilcolina. Esto da lugar a un incremento de su concentración, a la estimulación del AChR restante, y un incremento en la transmisión de señal. Otras terapias incluyen el uso de fármacos inmunosupresores, esteroides, o la extirpación quirúrgica de la glándula del timo para disminuir la tasa de producción de anticuerpos. Terapias futuras podrán incluir el uso de anticuerpos antiidiotipo contra los anticuerpos AChR, o la utilización de pequeños péptidos no antigénicos que compitan con los epítopos del AChR en la unión a los anticuerpos AChR.

Stefansson, K., Dieperink, M. E., Richman, D. P., Gomez, C. M. y Marton, L. S. *N. Engl. J. Med.* 312:221, 1985; Drachman, D. B. (Ed.). Myasthenia gravis: biology and treatment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 505:1, 1987; y Steinman, L. y Mantegazza, R. *FASEB J.* 4:2726, 1990.

tilcolina en la membrana postsináptica cesa por la acción del enzima **acetilcolinesterasa**, que hidroliza la acetilcolina a acetato y colina.

$$\text{Acetilcolina} + H_2O \rightleftharpoons \text{acetato} + \text{colina}$$

La colina es captada en su mayor parte por la membrana presináptica y se reutiliza para sintetizar más acetilcolina. El acetato pasa probablemente al flujo sanguíneo y se metaboliza en otros tejidos distintos del nervioso.

En la Figura 23.10 se muestra una estructura cristalográfica de acetilcolinesterasa, obtenida mediante rayos X. Su mecanismo de acción es similar al de las serina proteasas (véase p. 377). También posee una **tríada catalítica**, pero los aminoácidos que la componen, desde el extremos N-terminal al C-terminal, están dispuestos en orden inverso al que adoptan en las serina proteasas, y contienen glutamato en vez de aspartato.

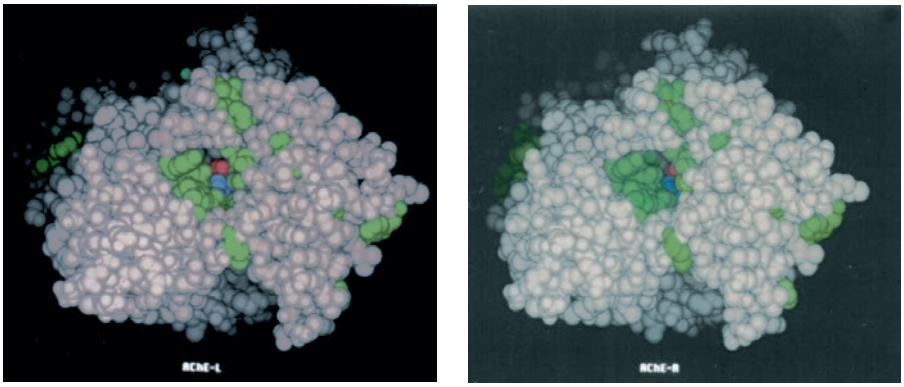


FIGURA 23.10
Imagen espacial estereoscópica de la acetilcolinesterasa con exposición del sitio activo.
El color verde indica los residuos aromáticos, en rojo la Ser^{200}, en azul el Glu^{199}, y en gris el resto de los residuos.
Reproducido con permiso de Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., et al. Science 253:872, 1991. Copyright © 1984 by American Association for the Advancement of Science.

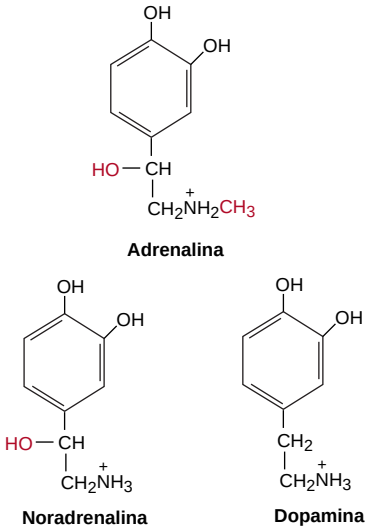


FIGURA 23.11
Neurotransmisores de tipo catecolamina.

Catecolaminas

Los **neurotransmisores de catecolaminas** son la **dopamina** (3,4-dihidroxifeniletilamina), la **noradrenalina** y la **adrenalina**, (Figura 23.11). Su biosíntesis se ha tratado anteriormente (p. 799). La acción de los neurotransmisores catecolamínicos se interrumpe por recaptación en la neurona presináptica llevada a cabo por proteínas transportadoras específicas. La cocaína, por ejemplo, se une al **transportador de dopamina** y bloquea su recaptación. Esto permite que la dopamina permanezca dentro de la sinapsis durante un período prolongado de tiempo y continúe estimulando los receptores de la neurona postsináptica. Tras su recaptación, estos neurotransmisores pueden ser empaquetados de nuevo en vesículas sinápticas, o bien pueden ser metabolizados. La **catecol-*O*-metiltransferasa** y la **monoamino oxidasa** están implicadas en su metabolismo (Figura 23.12). La catecol-*O*-metiltransferasa cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la *S*-adenosilmetionina a uno de los grupos OH fenólicos. La monoamino oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de estas aminas a aldehídos y iones amonio. La monoamino oxidasa puede utilizarlas como sustrato estén o no modificadas por la metiltransferasa. El producto final del metabolismo de la dopamina es el ácido homovaníllico y el de la adrenalina y noradrenalina el ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico.

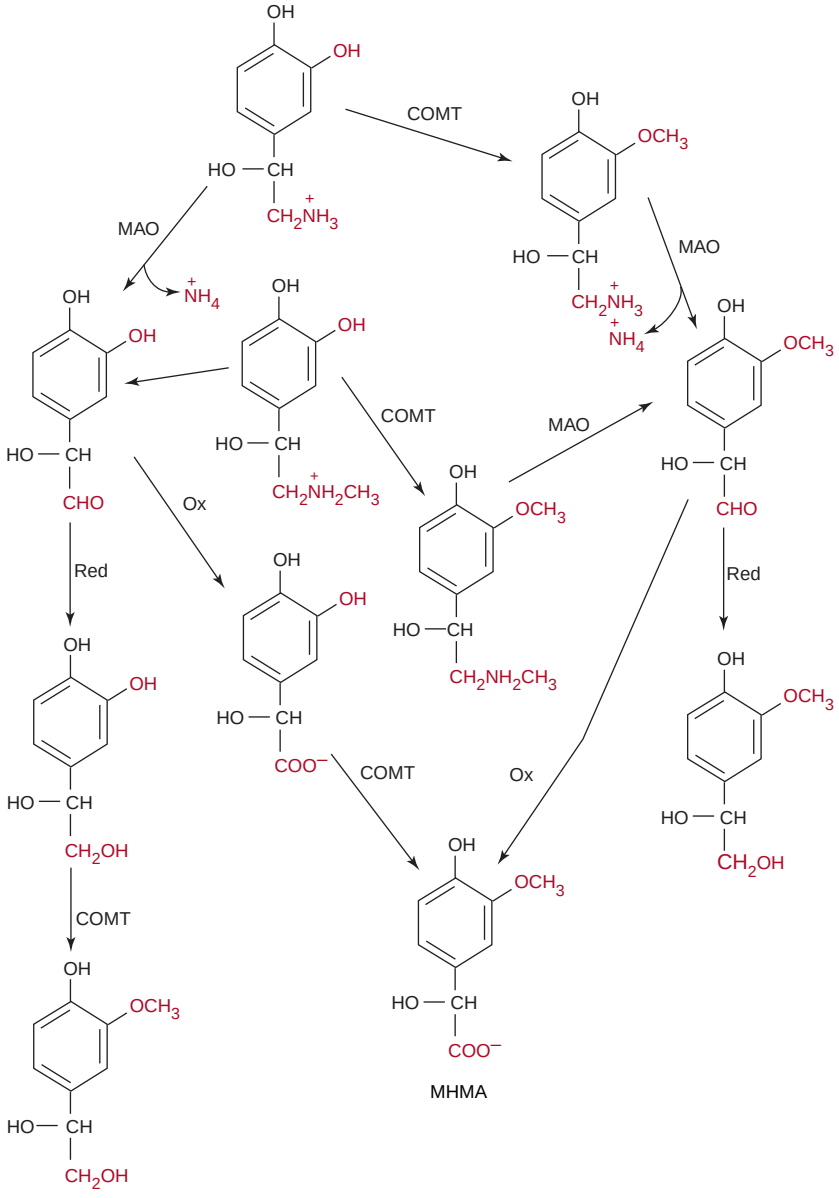


FIGURA 23.12
Rutas de degradación de las catecolaminas.
COMT, catecol-*O*-metil transferasa (requiere S-adenosilmetionina); MAO, monoamino oxidasa; Ox, oxidación; Red, reducción. El principal producto final del metabolismo de la adrenalina y la noradrenalina es el ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (MHMA).

5-Hidroxitriptamina (Serotonina)

La **serotonina**, **5-hidroxitriptamina**, proviene del triptófano (véase p. 810). Al igual que la dopamina, su acción se interrumpe por su **recaptación** mediante un transportador específico. Algunos tipos de depresión se asocian con niveles cerebrales bajos de serotonina. La acción de antidepresivos como el Paxil (clorhidrato de paroxetina), el Prozac (clorhidrato de fluoxetina) y el Zoloft (clorhidrato de sertralina) está relacionada con su capacidad de inhibir la recaptación de serotonina. Una vez en el interior de la neurona presináptica, la serotonina puede ser empaquetada de nuevo en vesículas sinápticas, o puede ser metabolizada. La ruta principal para su degradación es la desaminación oxidativa al correspondiente acetaldehído, en una reacción catalizada por el enzima monoamino oxidasa (Figura 23.13). Posteriormente, el aldehído se oxida a 5-hidroxindol-3-acetato mediante una aldehído deshidrogenasa.

γ-Aminobutirato

El neurotransmisor inhibidor **γ-aminobutirato (GABA)** se sintetiza y se degrada a través de una serie de reacciones conocidas habitualmente como **derivación del GABA**. En el cerebro, parece que el GABA y el glutamato, un neurotransmisor excitador, pueden tener en común algunas rutas del metabolismo en los astrocitos (Figura 23.14). Los astrocitos captan tanto el glutamato como el GABA y los convierten en glutamina que, a continuación, se transporta de nuevo a las neuronas presinápticas. En las neuronas excitadoras, la glutamina se convierte en glutamato y se empaqueta de nuevo en vesículas sinápticas. En las neuronas inhibidoras, la glutamina se convierte en glutamato, y a continuación en GABA, el cual es empaquetado de nuevo en vesículas sinápticas.

Se ha sugerido que los niveles cerebrales de GABA en algunos pacientes epilépticos pueden ser bajos. El **ácido valproico** (ácido 2-propilpentanoico) parece que aumenta los niveles cerebrales de GABA, aunque no está claro el mecanismo por el cual lo llevaría a cabo. El ácido valproico se metaboliza principalmente en el hígado por glucuronidación y excreción urinaria de los glucurónidos, o por β-oxidación mitocondrial y oxidación por los enzimas del retículo endoplasmático.

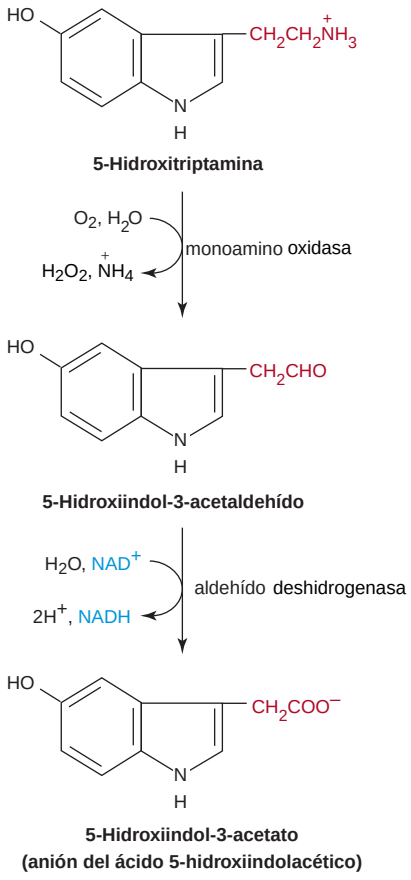


FIGURA 23.13
Degradación de la 5-hidroxitriptamina (serotonina).

Los neuropéptidos provienen de proteínas precursoras

Los **neurotransmisores peptídicos** se sintetizan generalmente como proteínas mayores que son cortadas mediante proteólisis para producir las moléculas de neuropéptidos. Su síntesis requiere la misma maquinaria bioquímica que la de cualquier

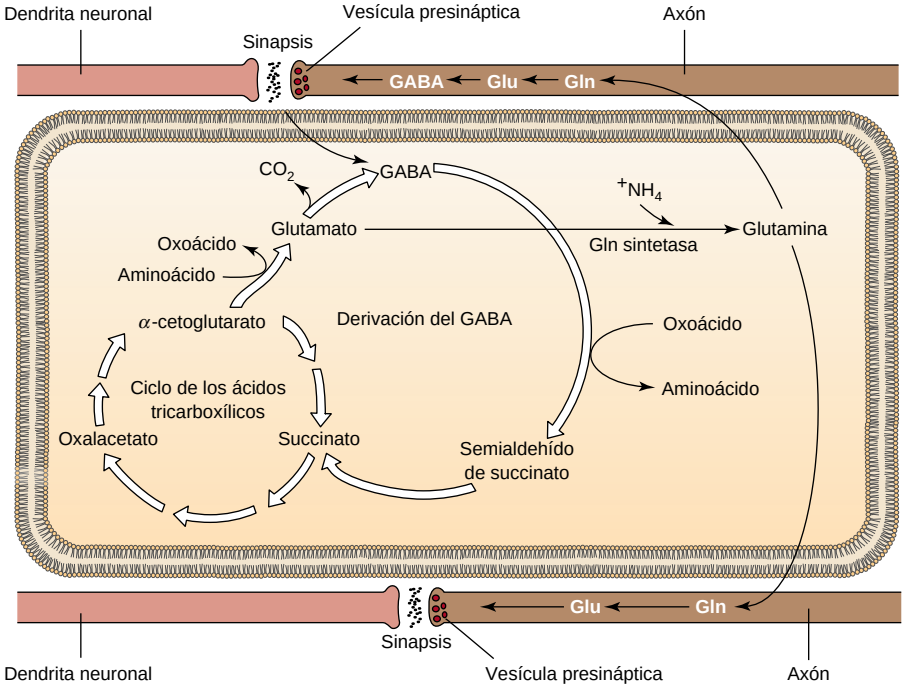


FIGURA 23.14
Participación de los astrocitos en el metabolismo de GABA y glutamato.

TABLA 23.3 Péptidos hallados en tejido cerebral[a]

Péptido	*Estructura*
β-Endorfina	Y G G F M T S E K S Q T P L V T L F K N A I I K N A Y K K G E
Met-encefalina	Y G G F M
Leu-encefalina	Y G G F L
Somatostatina	A G C K N F F W | | C S T F T K
Hormona de liberación de hormona luteinizante	p-E H W S Y G L R P G NH_2
Hormona de liberación de tirotropina	p-E H P-NH_2
Sustancia P	R P K P E E F F G L M-NH_2
Neurotensina	p-E L Y E N K P R R P Y I L
Angiotensina I	D R V Y I H P F H L
Angiotensina II	D R V Y I H P F
Péptido intestinal vasoactivo	H S D A V F T D N Y T R L R-K E M A V K K Y L N S I L N-NH_2

[a]Una p delante de la estructura indica que el extremo N-terminal de los péptidos es piroglutamato. NH_2 al final de la estructura indica que el extremo C-terminal es una amida.

síntesis proteica y tiene lugar en el cuerpo celular, no en el axón. Estos péptidos viajan a lo largo del axón hasta la región presináptica mediante uno de los dos mecanismos generales siguientes: el **transporte axónico rápido**, a una velocidad de aproximadamente 400 mm día^{-1}, y el transporte axónico lento, a una velocidad de 1-5 mm día^{-1}. Ya que la longitud de los axones puede variar entre 1 mm y 1 m, el tiempo de tránsito total puede variar teóricamente entre 150 ms y 200 días. No es muy probable que en condiciones fisiológicas normales se dé este último tiempo de tránsito, y es probable que el límite superior sea del orden de horas, más que de días. Algunos resultados experimentales sugieren que prevalecen los tiempos de tránsito más rápidos.

Los neuropéptidos intervienen en la mediación de respuestas sensoriales y emocionales tales como las asociadas a hambre, sed, sexo, placer y dolor. Incluidos en esta categoría se encuentran las **encefalinas**, las **endorfinas** y la **sustancia P**. La sustancia P es un neurotransmisor excitador que juega un papel en la transmisión del dolor, mientras que las endorfinas intervienen en la eliminación de la sensación de dolor. En la Tabla 23.3 se muestran algunos de los péptidos hallados en el tejido cerebral. Nótese que la Met-encefalina proviene de la región N-terminal de la β-endorfina. En muchos de los neurotransmisores peptídicos los aminoácidos tanto del extremo N-terminal como del C-terminal están modificados. Véase la p. 918 para una exposición adicional acerca de estos péptidos.

23.3 EL OJO: METABOLISMO Y VISIÓN

El ojo, nuestra ventana al mundo exterior, nos permite ver las maravillas de la naturaleza, las maravillas de la vida y, *véase* este libro, las maravillas de la bioquímica. ¿Cuáles son las características de este órgano que permiten esta visión? Una visión a través de cualquier ventana, a través de cualquier lente fotográfica, es más clara cuando no está obstruida. El ojo ha evolucionado de modo que se ha conseguido un objetivo similar. Está compuesto de tejidos vivos que requieren una nutrición continua y utilizan rutas metabólicas adecuadas a sus necesidades singulares. La energía y los metabolitos necesarios para su crecimiento y mantenimiento se obtienen a partir de nutrientes mediante mecanismos bioquímicos convencionales, pero las estructuras responsables de estos procesos están organizadas y distribuidas de forma que no interfieran con el proceso de la visión. Asimismo, el cerebro ha diseñado un sistema de filtración muy eficiente, mediante el cual los objetos del interior del ojo que podrían originar una distorsión en la visión, se vuelven invisibles. En la Figura 23.15 se muestra el esquema de una sección del ojo.

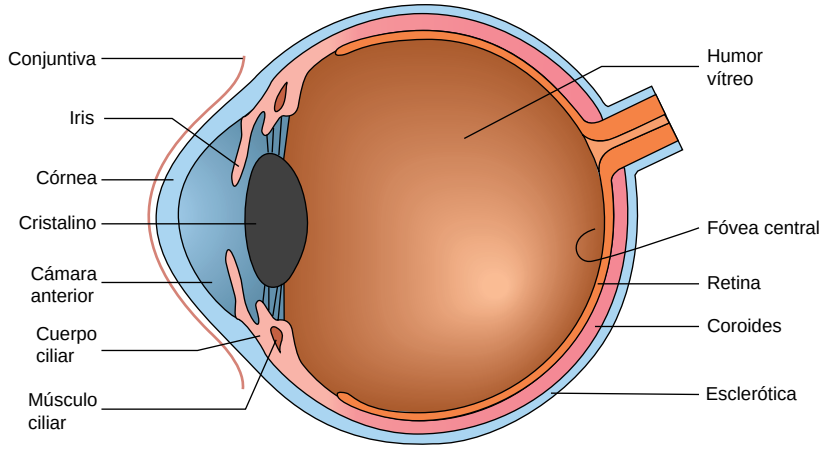


FIGURA 23.15
Esquema de una sección horizontal del ojo izquierdo.

La luz que entra en el ojo pasa progresivamente a través de la **córnea**; de la cámara anterior, constituida por el humor acuoso; el cristalino; el cuerpo vítreo, constituido por el humor vítreo; y, finalmente, se enfoca sobre la **retina**, que contiene el aparato sensitivo visual. El exterior de la córnea está bañado por las lágrimas, mientras que el interior lo está por el humor acuoso, un fluido isosmótico que contiene sales, albúmina, globulina, glucosa y otros componentes. El humor acuoso proporciona nutrientes a la córnea y al cristalino, y elimina productos finales del metabolismo de estos tejidos. El humor vítreo es una masa colagenosa o gelatinosa que ayuda a mantener la forma del ojo, aunque también le permite conservar cierta flexibilidad.

La córnea obtiene su ATP a partir del metabolismo aeróbico

El ojo es una extensión del sistema nervioso y, al igual que en otros tejidos del sistema nervioso central, el combustible metabólico principal es la glucosa. La córnea no es un tejido homogéneo y obtiene un porcentaje relativamente elevado de su ATP a partir del metabolismo aeróbico. Alrededor del 30% de la glucosa utilizada por la córnea se metaboliza mediante glucólisis, y alrededor del 65% lo hace mediante la ruta de las pentosas fosfato (véase p. 666). En base al peso relativo, la córnea se distingue por presentar una actividad de la ruta de las pentosas fosfato mayor que la de cualquier otro tejido de mamífero. También presenta una elevada actividad de **glutatión reductasa**, un enzima que requiere NADPH, producto de la ruta de las pentosas fosfato. El epitelio de la córnea es permeable al oxígeno atmosférico, que es necesario para varias reacciones oxidativas. Estas reacciones del oxígeno pueden dar lugar a la formación de varias **especies de oxígeno activas** que son perjudiciales para los tejidos, tal vez en algunos casos a través de la oxidación de grupos sulfhidrilo de proteínas a disulfuros. Se utiliza el glutatión reducido (GSH) para reducir de nuevo los disulfuros a su estado nativo original, mientras que el propio GSH se convierte en glutatión oxidado (GSSG). Además, también puede formarse GSSG por autooxidación. La glutatión reductasa utiliza NADPH para reducir GSSG a 2GSH.

$$GSSG + NADPH + H^+ \underset{}{\overset{\text{GSH reductasa}}{\rightleftharpoons}} 2\ GSH + NADP^+$$

La actividad de la ruta de las pentosas fosfato y de la glutatión reductasa mantiene este tejido en un estado reducido apropiado mediante una neutralización eficiente de las especies de oxígeno activas.

El cristalino es en su mayor parte agua y proteína

El **cristalino** está bañado por un lado por el humor acuoso, y por el otro está sustentado por el humor vítreo. El cristalino no tiene aporte sanguíneo, pero es un tejido metabólicamente activo. Obtiene sus nutrientes a partir del humor acuoso, al tiempo que elimina sus desechos en el mismo. El cristalino está constituido principalmente por agua y proteínas. La mayoría de las proteínas son las **cristalinas α,**

TABLA 23.4 Cristalinas del cristalino y su relación con otras proteínas

Cristalina	*Distribución*	[Relacionada] *o Idéntica*
α	Todos los vertebrados	**Proteínas pequeñas de choque térmico** (αB) [Antígeno de *Schistosoma mansoni*]
β	Todos los vertebrados	[Proteína S de *Myxococcus xanthus*]
γ	(las aves no tienen γ embrionaria)	[Esferulina 3a de *Physarum polycephatum*]
Cristalinas enzimáticas específicas de taxón		
δ	La mayoría de aves, reptiles	**Argininosuccinato liasa** (δ2)
ε	Cocodrilos, algunas aves	**Lactato deshidrogenasa B**
ξ	Conejo de Indias, camello, llama	**NADPH: quinona oxidorreductasa**
η	Musaraña gigante	**Aldehído deshidrogenasa I**

Fuente: Wistow, G. *Trends Biochem. Sci.* 18:301, 1993.

***β* y *γ*.** También contiene albuminoides, enzimas y proteínas de membrana que se sintetizan en una capa epitelial situada alrededor del borde del cristalino. Otros tipos de proteínas presentes en el cristalino, incluidos los cristalinos de especies de invertebrados, se indican en la Tabla 23.4. Las proteínas de los cristalinos pueden tener distintos orígenes genéticos y distintas funciones en otros tejidos. El requisito físico más importante de estas proteínas es el de mantener un estado cristalino transparente. El área central del cristalino, el núcleo, está formada por las células del cristalino que estaban presentes al nacer. El cristalino crece desde la periferia (Figura 23.16). Con la edad el cristalino humano aumenta en peso y grosor y se vuelve menos elástico. A esto se acompaña una pérdida de la visión cercana (Tabla 23.5), estado conocido como **presbiopia**. En promedio, desde el nacimiento hasta la edad de 80 años, el cristalino puede aumentar tres veces de tamaño y aproximadamente una vez y media de grosor.

Las proteínas del cristalino han de mantenerse en un estado nativo sin agregar. Estas proteínas son sensibles a varias agresiones, tales como cambios en el estado de oxidación–reducción, la osmolaridad, concentraciones demasiado elevadas de metabolitos y la radiación UV. La integridad estructural del cristalino es mantenida mediante la ATPasa intercambiadora de Na^+, K^+ (véase p. 522) para el equilibrio osmótico, la glutatión reductasa para el equilibrio del estado redox, y la síntesis proteica para el crecimiento y el mantenimiento. La energía necesaria para estos procesos procede del metabolismo de la glucosa. Aproximadamente el 85% de la glucosa metabolizada por el cristalino lo hace a través de la glucólisis, el 10% por la ruta de las pentosas monofosfato y el 3% por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, presumiblemente por parte de las células localizadas en la periferia.

La **catarata** es la única enfermedad conocida del cristalino. Las cataratas son opacidades del cristalino producidas por una pérdida de la osmolaridad y un cam-

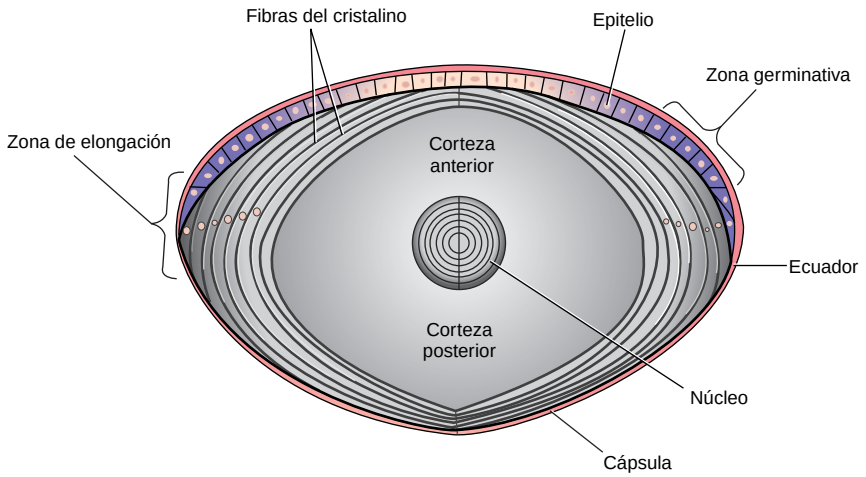


FIGURA 23.16
Esquema de una sección meridional de un cristalino de mamífero.

bio en la solubilidad de alguna de las proteínas del cristalino. Esto da como resultado la presencia de regiones con elevada dispersión de la luz. Las cataratas afectan a aproximadamente 1 millón de personas por año (en los EE.UU.) y no se conocen medidas curativas o preventivas. El remedio es la sustitución del cristalino, que es una operación muy común en los Estados Unidos. Básicamente existen dos tipos de cataratas: las **cataratas seniles** y las **cataratas por diabetes**. El problema del cristalino es el mismo en ambos casos: variaciones en la solubilidad y estado de agregación de las cristalinas. En las cataratas seniles, los cambios en la disposición arquitectónica de las cristalinas del cristalino dependen de la edad y se deben a la degradación de las moléculas proteicas a partir del extremo C-terminal, desamidación y racemización de los residuos aspartilo. Las cataratas por diabetes son el resultado de un incremento de osmolaridad del cristalino debido a la actividad de la **aldosa reductasa** y la **poliol (aldosa) deshidrogenasa** de la ruta metabólica del poliol. Cuando la concentración de glucosa en el cristalino es elevada, la aldosa reductasa reduce una parte de aquélla hasta **sorbitol** (Figura 23.17), que puede convertirse en **fructosa** mediante la poliol deshidrogenasa. En el cristalino humano, la relación entre las actividades de estos dos enzimas favorece la acumulación de sorbitol, especialmente porque el sorbitol no se utiliza de otro modo y difunde fuera del cristalino bastante lentamente. La acumulación de sorbitol en el cristalino conduce a un aumento en la osmolaridad del mismo, afecta a la organización estructural de las proteínas cristalinas del interior del cristalino, y estimula su velocidad de agregación y desnaturalización. Las áreas en las que se produce este fenómeno presentan un aumento en la dispersión de la luz, que es la definición de las cataratas. Normalmente, la formación de sorbitol no es un problema, ya que la K_m de la aldosa reductasa para la glucosa es de aproximadamente 200 mM y por tanto se forma muy poco sorbitol. En los diabéticos, en los que la concentración de glucosa en circulación es elevada, puede observarse una actividad significativa de este enzima.

TABLA 23.5 Cambios en la distancia focal con la edad

Edad (años)	*Distancia focal (cm)*
10	7,1
20	11,2
35	24,9
45	66,5
70	609,6

Fuente: Adaptado de Koretz, J. F. y Handelman, G. H. *Sci. Am.*, 92, July 1988.

La retina obtiene su ATP a partir de la glucólisis anaeróbica

La **retina**, al igual que el cristalino, depende en gran manera de la glucólisis anaeróbica para la producción de ATP. A diferencia del cristalino, la retina es un tejido vascular, aunque esencialmente no presenta vasos sanguíneos en el área donde es mayor la agudeza visual, la **fóvea central** (Apli. Clín. 23.3). En las células de la retina, incluidos bastones y conos, existen mitocondrias, excepto en los segmentos externos de los bastones y conos, que es donde se localizan los pigmentos visuales.

El NADH producido durante la glucólisis reduce piruvato a lactato. La lactato deshidrogenasa de la retina utiliza tanto NADH como NADPH. No está claro si la

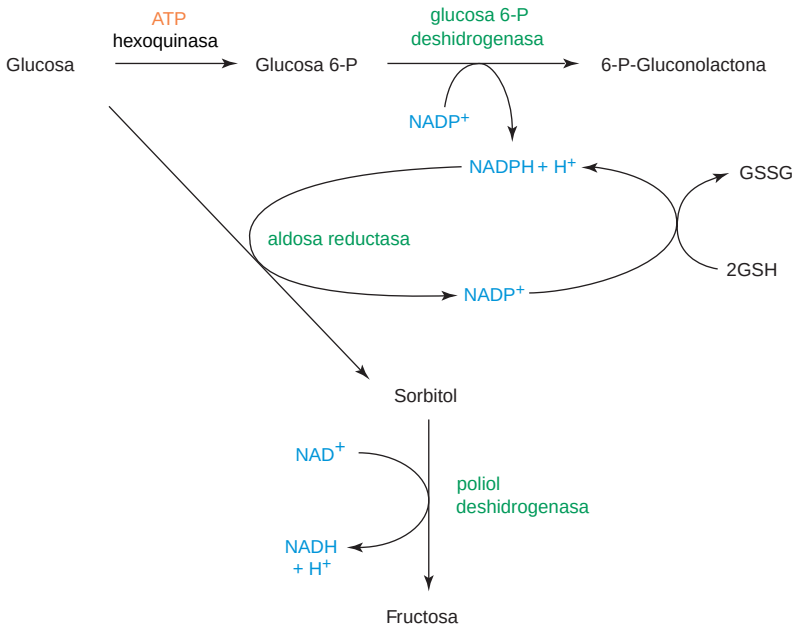
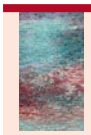


FIGURA 23.17
Interrelaciones del metabolismo del cristalino.



APLICACIÓN CLÍNICA 23.3
Degeneración de la mácula y otras causas de pérdida de la visión

Muchas de las enfermedades oculares afectan a la visión, y no todas tienen un origen bioquímico claro. Las enfermedades oculares más graves son aquellas que conducen a la ceguera. La más común es el glaucoma, y existe una relación causal directa con la diabetes, cuya bioquímica es bien conocida. Existen tratamientos para el glaucoma, de modo que la ceguera no tiene por qué ser un resultado del mismo. La degeneración de la mácula conduce a la ceguera, y no existe una curación para esta enfermedad. La mácula es un área circular de la retina, en cuyo centro se encuentra la fóvea central, la zona con la mayor concentración de conos y una de las de mayor agudeza visual. La degeneración de la mácula puede ser una de las causas principales de ceguera en individuos mayores de 50 años. Esta degeneración puede ser de dos tipos: seca o húmeda. La forma seca se desarrolla de forma gradual en el tiempo, mientras que la forma húmeda lo hace rápidamente y puede ocasionar la ceguera en un período de días. La degeneración de la mácula ocurre cuando los vasos sanguíneos que se encuentran por debajo de la mácula se rompen, lo cual origina una pérdida del aporte nutritivo y una rápida pérdida de la visión. Se está experimentando con procedimientos que permitan extirpar la cicatriz que se origina y trasplantar tejidos de la zona posterior del ojo para restablecer el aporte de nutrientes a las células fotorreceptoras.

En algunos casos, los efectos de la rotura de vasos sanguíneos que oscurecen la mácula y que dan lugar a una ceguera repentina pueden ser temporales. Se han detectado seis casos de pérdida repentina de visión asociada con una actividad sexual y no asociada con enfermedades de transmisión sexual. En estos casos se produjo una pérdida de visión en un ojo aparentemente durante una actividad sexual bajo un "nivel de estimulación muy alto", si bien la mayoría de los pacientes informaron de lo sucedido unos días después del episodio. La ceguera era debida a la rotura de vasos sanguíneos en el área de la mácula. Durante la visita al oftalmólogo, los pacientes se resistían a hablar acerca de la actividad que realizaban cuando se detectó la pérdida de la visión. Cuatro de los pacientes se recuperaron cuando la visión se restableció por reabsorción de la sangre. En uno de los casos, en que la sangre estaba atrapada entre el humor vítreo y la superficie de la retina, directamente frente a la fóvea, la hemorragia sólo se reabsorbió parcialmente durante el mes siguiente, pero no mejoró la agudeza visual. El paciente no acudió a exámenes posteriores, pero nada indicaba que esta condición sería permanente. Dado que la mayoría de las personas afectadas por este fenómeno se encuentran por encima de los 39 años de edad, ésta puede ser una causa de mayor preocupación para profesores que para alumnos, y puede dar un nuevo significado a la frase "el amor es ciego".

Friberg, T. R., Braunstein, R. A. y Bressler, N. M. *Arch. Ophthalmol.* 113:738, 1995.

lactato deshidrogenasa de la retina juega algún papel en la regulación del metabolismo de la glucosa a través de la ruta glucolítica o de las pentosas monofosfato mediante el uso selectivo de NADH o NADPH.

En el proceso de la transducción visual intervienen fenómenos fotoquímicos, bioquímicos y eléctricos

En la Figura 23.18 se muestra un micrografía electrónica y un esquema de la membrana de la retina. La luz que entra en el ojo a través del cristalino atraviesa las fibras del nervio óptico, las neuronas ganglionares, las neuronas bipolares y los núcleos de conos y bastones antes de alcanzar los segmentos externos de los bastones y conos donde se inicia el proceso de transducción de señal. La capa **epitelial pigmentada** del ojo, la coroides, se localiza detrás de la retina y absorbe el exceso de luz, evitando que ésta se refleje de nuevo hacia los bastones y conos, donde podría hacer que la imagen se distorsionara o volviera borrosa (véase Apli. Clín. 23.4).

Se podría comparar el ojo con una videocámara, que capta imágenes, las convierte en impulsos eléctricos, los graba sobre una cinta magnética y permite visualizarlas descodificando la información de la cinta. El ojo enfoca una imagen proyectándola sobre la retina. En este punto se inician una serie de fenómenos, el primero de los cuales es fotoquímico, seguido por otra serie de fenómenos bioquímicos que amplifican la señal; finalmente, se envían una serie de impulsos eléctricos al cerebro, donde se reconstruye la imagen en el "ojo de la mente". Durante este proceso el fenómeno inicial, a través de una serie de fenómenos bioquímicos, ha pasado de ser un fenómeno físico a ser una reacción química, y a partir de un fenómeno eléctrico se ha transformado en un reconocimiento consciente de la presencia de un objeto en el medio externo al cuerpo.

Los fotones de luz son absorbidos por fotorreceptores en el **segmento externo** del **bastón** o del **cono**, donde producen una isomerización del pigmento visual, el **retinal**, desde la forma 11-*cis* a la forma todo-*trans*. Esta isomerización provoca a su vez un cambio de conformación en la parte proteica del complejo que afecta al potencial de membrana en reposo de la célula lo que da como resultado la transmisión de una señal eléctrica a través del nervio óptico al cerebro. Estos procesos se estudiarán con mayor detalle más adelante.

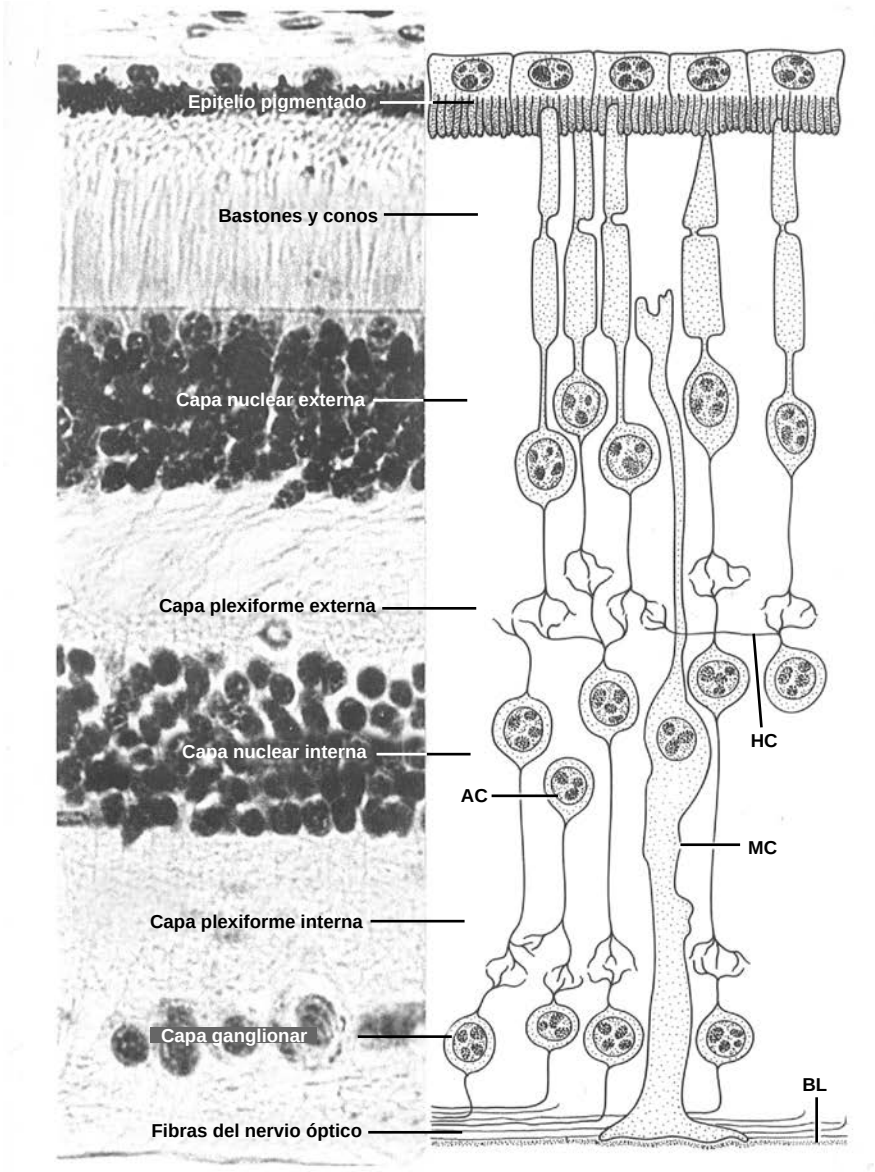
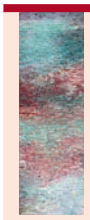


FIGURA 23.18
Micrografía electrónica y representación esquemática de las células de la retina humana. Los extremos de los bastones y conos se sumergen en el epitelio pigmentado de la capa más externa. Los bastones y conos forman uniones sinápticas con muchas neuronas bipolares, las cuales a su vez forman sinapsis con células de la capa ganglionar que, a través del nervio óptico, envían axones al cerebro. Para integrar la información es importante que un bastón o un cono establezca sinapsis con muchas células. HC, Células horizontales; AC, Célula amacrina; MC, Célula de Müller; BL, Lámina basal.
Reproducido con permiso de Kessel, R. G. y Kardon, R. H. Tissues y Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy. *New York: W. H. Freeman, 1979, p. 87. Copyright R. Kessel y R. H. Kardon, todos los derechos reservados.*

Las células fotorreceptoras son los bastones y los conos

Las **células fotorreceptoras** del ojo son los bastones y los conos (Figura 23.18). Tanto en los conos como en los bastones hay discos planos que contienen un pigmento fotorreceptor. En las células bastón, este pigmento es la **rodopsina**, y en los conos son los pigmentos rojo, verde o azul. La rodopsina es una proteína transmembrana a la que se une un grupo prostético, el **11-*cis*-retinal**. La proteína sin su grupo prostético es la **opsina**. Las tres proteínas que forman los pigmentos rojo, verde y azul de los conos son distintas entre sí y de la opsina.



APLICACIÓN CLÍNICA 23.4
Enfermedad de Niemann–Pick y retinitis pigmentosa

Existen alteraciones del sistema nervioso central relacionadas con el grupo de enfermedades de Niemann–Pick, las cuales se manifiestan como variaciones oculares. Algunas de éstas se pueden observar como máculas anormales con decoloración grisácea y pigmentación granular u opacidades granulosas alrededor de la fóvea.

La enfermedad aguda de tipo I de Niemann–Pick, una lipidosis con carencia de esfingomielinasa y depósitos primarios de esfingomielina, puede presentar, en un 50% de los pacientes, una mancha de color rojo cereza en la retina. En algunos pacientes con enfermedad subaguda del tipo I se puede observar el síndrome del halo en la mácula, que se debe a opacidades cristaloides. Éstas forman un halo de aproximadamente la mitad del diámetro del disco en su borde exterior, y se encuentran difusas a través de las distintas capas de la retina. No interfieren con la visión.

En una paciente de 11 años de edad con enfermedad de tipo II se observó una mayor afección ocular. Presentaba depósitos de esfingomielina en los queratocitos de la córnea, el cristalino, las células ganglionares de la retina, el epitelio pigmentado, el conducto de la córnea y los astrocitos fibrosos del nervio óptico.

La retinitis pigmentosa se presenta como efecto secundario de las alteraciones bioquímicas asociadas con la enfermedad de Niemann–Pick.

Spence, M. W. y Callahan, J. W. Sphingomyelin-cholesterol lipidoses: the Niemann–Pick group of diseases. En: C. R. Schriver, A. L. Beaudet, W. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill, 1989, p. 1656.

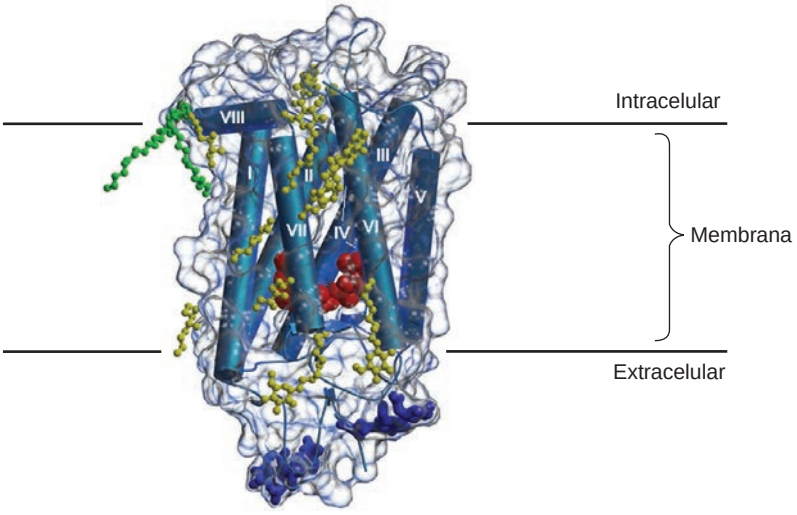


FIGURA 23.19
Estructura cristalina de la rodopsina bovina a 2,8 Å de resolución.
La rodopsina es una proteína transmembrana. El espesor de la membrana en que la rodopsina está incrustada es aproximadamente equivalente a la longitud de las hélices (cilindros azules). La cara intracelular de la membrana corta aproximadamente la hélice VIII. Las cadenas β se muestran como flechas azules. Las estructuras en verde en el lado intracelular son dos grupos palmitilo orientados de manera que los grupos hidrofóbicos pueden interaccionar con las regiones hidrofóbicas de la membrana. Las estructuras de bolas y barras en azul en la parte inferior (cara extracelular) de la molécula son glúcidos. Las estructuras en amarillo localizadas cerca de la superficie hidrofóbica de la proteína son moléculas de nonilglucósido y heptaneol.
Adaptado con permiso de Teller, D. C., Okada, T., Behnke, C. A., Palczewski, K. y Stenkamp, R. E. Biochemistry 40: 7761, 2001. Copyright, 2001, American Chemical Society. Figura proporcionada generosamente por el Dr. K. Palczewski y Dr. C. A. Behnke.

La rodopsina, de aproximadamente 40 kDa, contiene siete hélices α transmembrana. El 11-*cis*-retinal está unido a través de una base de Schiff protonada al grupo ε-amino de la Lys^{296}, en la séptima hélice, que se encuentra a mitad de camino entre las dos caras de la membrana (véase Figura 23.19). Véase también la Apli. Clín. 23.5.

En la Figura 23.20 se muestra la formación del 11-*cis*-retinal a partir del **β-caroteno** y de la rodopsina a partir de la opsina y el 11-*cis*-retinal. El 11-*cis*-retinal se obtiene de la **vitamina A** y del β-caroteno de la dieta. Éstos son transportados a sitios específicos del cuerpo unidos a proteínas transportadoras específicas. La escisión del β-caroteno da lugar a dos moléculas de **todo-*trans*-retinol.** En la capa de células epiteliales pigmentada de la retina hay un enzima que cataliza la isomerización del todo-*trans*-retinol a **11-*cis*-retinol**. La oxidación del 11-*cis*-retinol a 11-*cis*-retinal y su unión a la opsina se produce en el segmento externo del bastón.

En la Figura 23.21 se muestran los espectros de absorción del 11-*cis*-retinal y de los cuatro pigmentos visuales. Al unirse a la opsina y a los componentes proteicos de los otros pigmentos visuales se produce un desplazamiento en la longitud de onda de máxima absorción del 11-*cis*-retinal. Las bandas de absorción de los pigmentos coinciden con su sensibilidad a la luz.

La magnitud de la variación en el potencial eléctrico de las células fotorreceptoras tras una exposición a un pulso lumínico es distinta de la de las neuronas durante la despolarización. El **potencial en reposo** de la membrana de los bastones es de unos -30 mV en contraste con -70 mV para las neuronas. La excitación de los bastones da lugar a la **hiperpolarización** de la membrana, desde unos -30 mV a unos -35 mV (véase Figura 23.22). Se necesitan décimas de segundo para que el potencial alcance su estado de máxima hiperpolarización. Durante este intervalo de tiempo, y antes de que el potencial regrese a su estado de reposo, tienen lugar gran número de fenómenos bioquímicos.

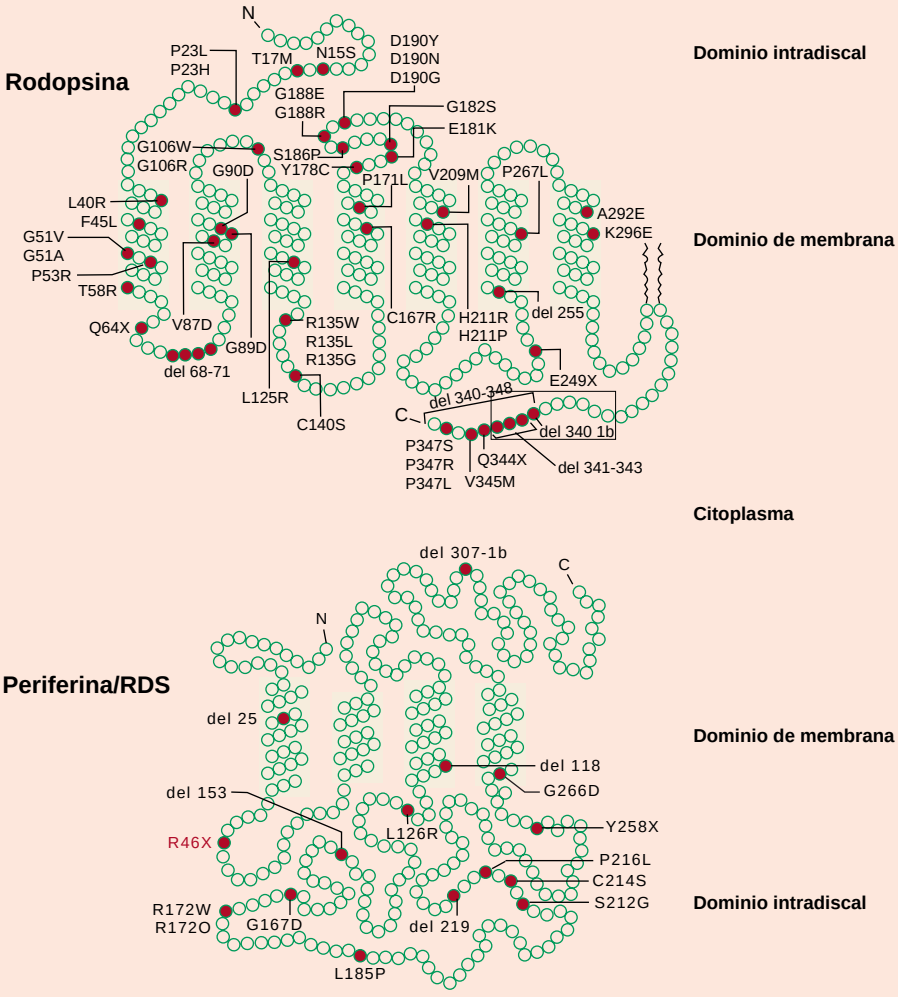
Los fenómenos iniciales, la absorción de fotones y la posterior isomerización del 11-*cis*-retinal, son rápidos y requieren sólo picosegundos. A continuación se producen una serie de cambios en la rodopsina que conducen a varios estados conformacionales de vida corta (véase Figura 23.23), cada uno de los cuales presenta características de absorción específicas. No se conocen las estructuras exactas de estos intermedios. Esta claro que derivan de los cambios conformacionales que sufre la parte proteica de la rodopsina cuando el 11-*cis*-retinal se isomeriza a todo-*trans*-retinal. La Figura 23.24, un esquema de la estructura 3-D de la rodopsina, muestra las cadenas laterales de aminoácidos que rodean al 11-*cis*-retinal, visto desde el lado citoplasmático. Cuando el 11-*cis*-retinal sufre la isomerización a todo-*trans*-retinal, el anillo de β-ionona del todo-*trans*-retinal alcanza la Ala^{169} en la hélice IV. La proteína debe sufrir varios cambios conformacionales para que esto ocurra. Las especies intermedias reseñadas en la Figura 23.23 representan algunas de estas conformaciones. Por último, la rodopsina se disociacia, dando opsina y todo-*trans*-retinal.

APLICACIÓN CLÍNICA 23.5

Retinitis pigmentosa como resultado de una mutación en el gen de la periferina

Con el nombre de retinitis pigmentosa (RP) se conoce un grupo heterogéneo de enfermedades con orígenes clínicos y genéticos variables. El origen de varias de estas enfermedades es un metabolismo lipídico anormal. Esta enfermedad afecta aproximadamente a 1,5 millones de personas en todo el mundo. Se trata de una alteración lenta y progresiva asociada con la pérdida de visión nocturna y periférica. Se puede heredar de forma autosómica dominante, recesiva o ligada al cromosoma X. La RP se ha relacionado con mutaciones en la porción proteica de la rodopsina y en una proteína relacionada, la periferina/RDS, siendo ambas proteínas integrales de membrana. La periferina es una proteína de 344 aminoácidos localizada en la región exterior de la membrana discal. En la figura que se muestra a continuación se presentan modelos estructurales de ambas proteínas. Los círculos densos y otros símbolos indican residuos o regiones que han sido relacionados con la RP u otras degeneraciones de la retina.

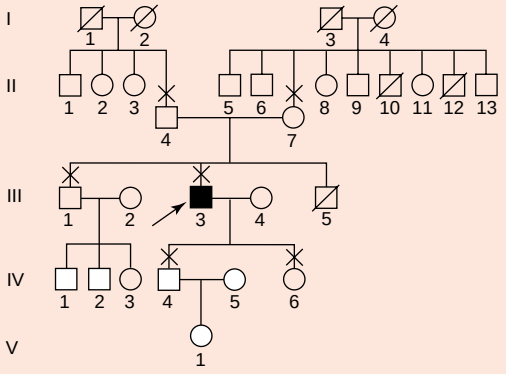
Se ha descrito un caso en que una mutación *de novo* en el exón 1 del gen que codifica la periferina causó la aparición de RP. Mediante técnicas de biología molecular, Lam et al. (1995) identificaron el cambio específico que tenía lugar en la periferina: la transición de C a T en el primer nucleótido del codón 46. Esta mutación cambiaba una arginina por un codón de terminación (R46X). En la siguiente figura se muestra el árbol genealógico de la familia afectada. Ninguno de los padres presentaba la mutación, y según los análisis genéticos (20 polimorfismos diferentes de repeticiones cortas en tándem) mostraban que la probabilidad de que los progenitores no fueran los padres biológicos era menor a 1 entre 10 mil millones. Ello establece prácticamente con total certeza que la mutación es *de novo*.



Representación esquemática de los modelos estructurales de la rodopsina (arriba) y de la periferina/RDS (abajo).
La posición de las mutaciones en los aminoácidos que se segregan con la RP u otras degeneraciones de la retina se indican mediante círculos de color rojo.
De Lam et al. (1995).

Continúa en la p. 1010.

Apli. Clín. 23.5 (continuación)



Genealogía de la familia.
Los varones se representan mediante cuadros y las hembras mediante círculos. El cuadro negro indica la persona afectada. Una barra sobre un signo significa que el miembro ha fallecido.
De Lam et al. (1995).

Esta mutación R46X se ha observado en otro paciente no relacionado. Tales observaciones demuestran la importancia del uso de los análisis de DNA para establecer las bases genéticas de la RP, especialmente si se considera que los síntomas de la RP se han relacionado con muchas otras enfermedades como las que implican alteraciones en el metabolismo lipídico.

Shastry B. S. Retinitis pigmentosa and related disorders: phenotypes of rhodopsin and peripherin/RDS mutations. *Am. J. Med. Genet.* 52:467, 1994: y Lam, B. L., Vandenburgh, K., Sheffield, V. C. y Stone, E. M. Retinitis pigmentosa associated with a dominant mutation in codon 46 of the peripherin/RDS gene (Arg^{46}stop). *Am. J Ophthalmol.* 119:65, 1995.

A 37°C, la rodopsina activada decae en algo más de 1 ms, a través de varios intermedios, a **metarrodopsina II**, que tiene una vida media de aproximadamente 1 min. Es la especie de **rodopsina activa**, R*, la que interviene en las reacciones bioquímicas de interés. La metarrodopsina II se empezaría a formar en un intervalo de centésimas de microsegundo a partir del fenómeno inicial. Toda la primera serie de reacciones que se muestran en la Figura 23.23 se llevan a cabo en el interior de los discos, en la zona externa de los bastones. Tras la disociación de la metarrodopsina en opsina y todo-*trans*-retinal, éste se convierte enzimáticamente en todo-*trans*-retinol mediante la **todo-*trans*-retinol deshidrogenasa**, localizada en la zona externa de los bastones. El todo-*trans* retinol es transportado (o difunde) hacia el epitelio pigmentado, en donde una isomerasa específica lo convierte en 11-*cis*-retinol. A continuación éste es transportado (o difunde) de nuevo hacia la zona externa del bastón y es reoxidado a 11-*cis*-retinal. Dado que la todo-*trans*-retinol deshidrogenasa presenta tan sólo el 6% de su actividad con el 11-*cis*-retinal como sustrato, parece ser que otro enzima sería responsable de la oxidación del 11-*cis*-retinol a 11-*cis*-retinal. Una vez formado el aldehído, se puede combinar de nuevo con la opsina para dar lugar a rodopsina. Ésta se encuentra en condiciones de empezar el ciclo de nuevo. Los mismos acontecimientos tienen lugar con las tres proteínas de los pigmentos rojo, verde y azul, en los conos.

Existen tres "mini" ciclos bioquímicos interconectados en la conversión de la energía lumínica en impulsos nerviosos (véase Figura 23.25). Estos ciclos describen las reacciones de la rodopsina, la **transducina** y la **fosfodiesterasa**, respectivamente. El resultado neto de su operación es una hiperpolarización de la membrana plasmática del bastón (o del cono), es decir, desde −30 mV hasta aproximadamente −35 mV. Es importante comprender primero cómo se mantiene la membrana plasmática a −30 mV.

Los bastones de un ojo humano plenamente adaptado a la oscuridad pueden detectar un destello de luz que emita solamente 5 fotones. El bastón es un tipo especializado de neurona en la que la señal generada no depende de un fenómeno de todo o nada. La señal puede ser graduada en intensidad, y ésta repercutirá en la magnitud de la variación en milivoltios que sufre el potencial de membrana plasmática desde su estado de reposo de –30 mV. Este **potencial de reposo** se mantiene en un valor más positivo porque los **canales de Na^+** de las células fotorreceptoras tienen una **compuerta regulada por ligando** y se mantienen en un estado parcialmente abierto. El ligando responsable de mantener algunos de los canales de Na^+ abiertos es el **GMP**

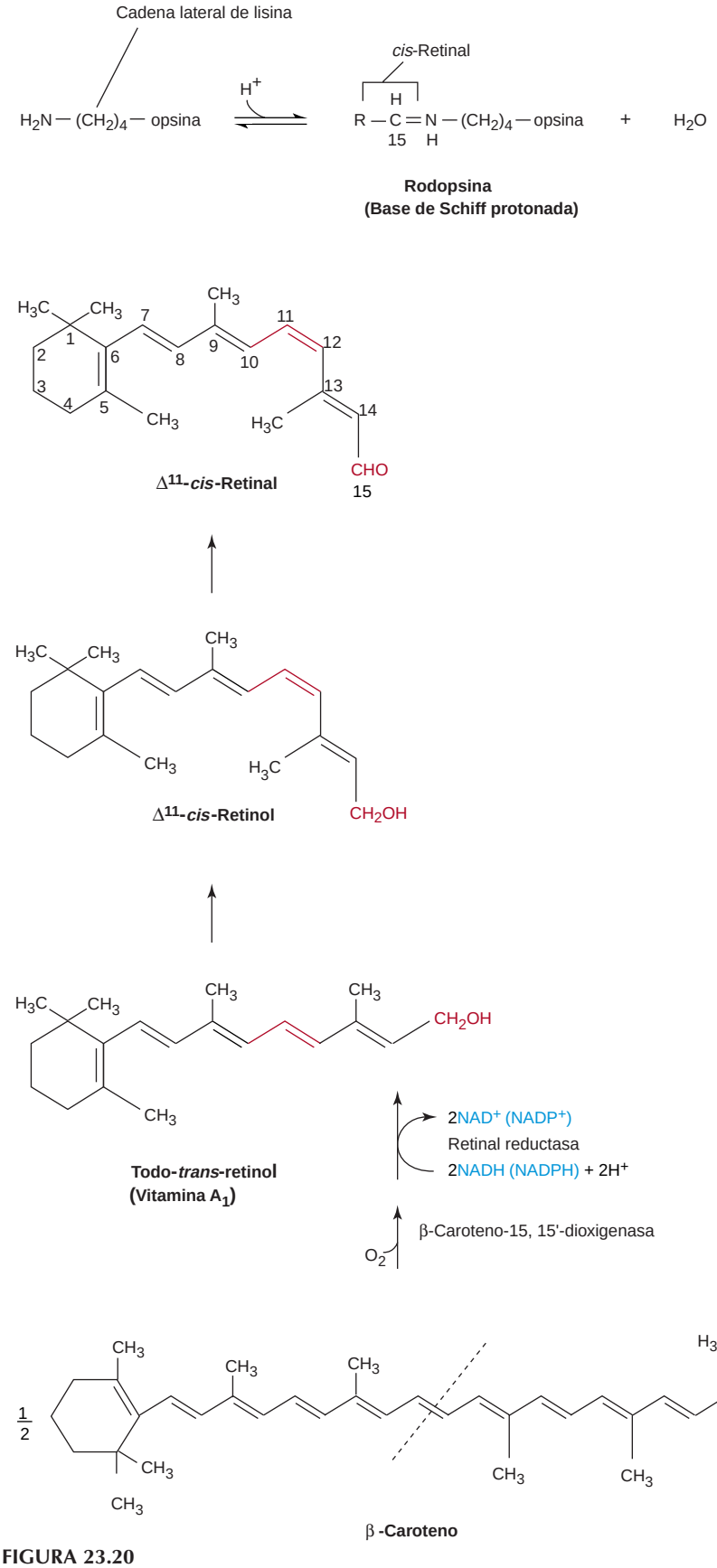


FIGURA 23.20
Formación del 11-*cis*-retinal y de la rodopsina a partir del *β*-caroteno.

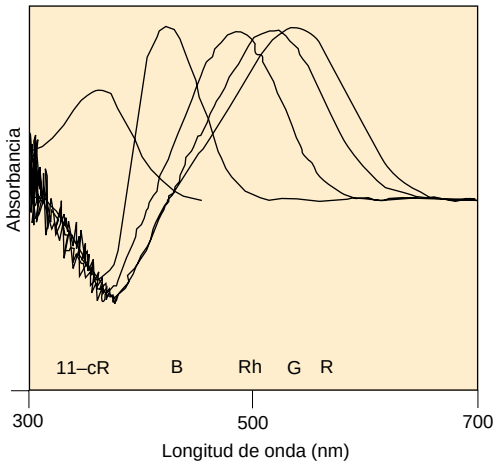


FIGURA 23.21
Espectro de absorción del 11-*cis*-retinal y de los cuatro pigmentos visuales.
La absorbancia es relativa, y para los pigmentos se obtuvo como el espectro de diferencia de las apoproteínas recombinantes reconstituidas. El espectro del 11-*cis*-retinal (11-cR) se muestra en ausencia de proteína. B, pigmento azul; Rh, rodopsina; G, verde; R, rojo.
Adaptado de Nathans, J. Cell 78:357, 1994.

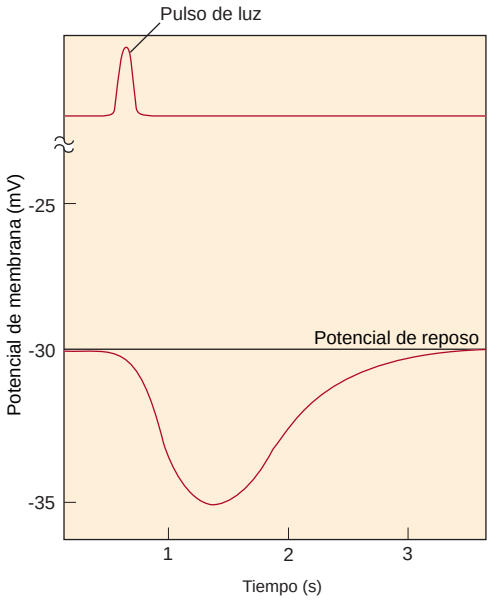


FIGURA 23.22
Cambios en el potencial de membrana de un bastón tras un pulso de luz.
Tomado de Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. Molecular Cell Biology. New York: Scientific American Books, 1986, p. 763.

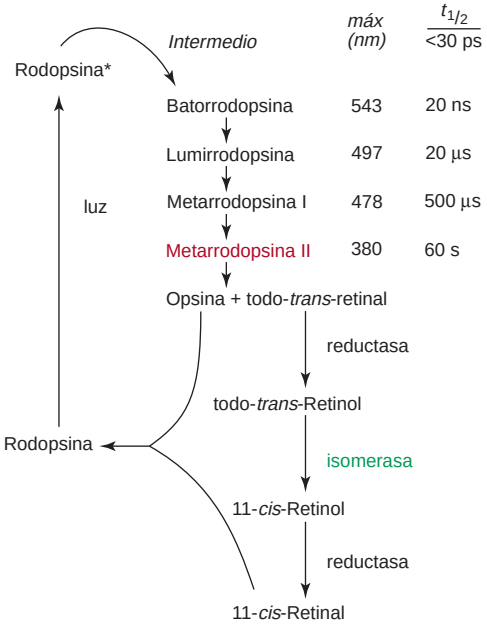


FIGURA 23.23
Activación de la rodopsina por la luz.

cíclico (cGMP). El cGMP se une a ellos en función de su concentración y con una cinética dinámica. Los fenómenos bioquímicos que afectan a la concentración de cGMP en el interior de los conos y los bastones afectan asimismo al número de canales de Na^+ que se encuentran abiertos, y por consiguiente, al potencial de membrana (véase Figura 23.25).

La rodopsina activa (R*, a saber metarrodopsina II) forma un complejo con la transducina. La transducina es una típica **proteína G** trimérica que funciona de un modo muy similar al descrito en la p. 925. En el complejo R*–transducina (complejo R*–$T_{\alpha\beta\gamma}$), la transducina experimenta un cambio conformacional que facilita un intercambio de su **GDP** unido con **GTP**. Cuando ello ocurre, la subunidad α (T_α) del trímero se disocia de las subunidades β y γ. La T_α interacciona con la **fosfodiesterasa (PDE)** y la activa. La PDE hidroliza cGMP a 5′-GMP, lo cual da lugar a una disminución de concentración del cGMP y también del número de canales que se mantienen abiertos. El potencial de membrana se hace más negativo, es decir, se hiperpolariza.

El diagrama que se presenta en la Figura 23.25 muestra un esquema de dos canales de este tipo, incrustados en la membrana plasmática; uno de ellos presenta un cGMP unido y se mantiene abierto; el otro no presenta cGMP unido y se encuentra cerrado. Mediante este mecanismo, la concentración de Na^+ en la célula está directamente relacionada con la concentración de cGMP, y por consiguiente, también con el potencial de membrana. La PDE de los bastones es una **proteína heterotetramérica** que se compone de dos subunidades catalíticas, una α y una β, y de dos subunidades reguladoras γ. La T_α–GTP forma un complejo con las subunidades γ de la PDE, lo cual da lugar a su disociación de las subunidades catalíticas y libera así el complejo dimérico catalíticamente activo de las subunidades α y β de la PDE. La T_α tiene actividad GTPasa. La hidrólisis del GTP unido en GDP y fosfato inorgánico (P_i) da lugar a la disociación de la T_α de las subunidades γ reguladoras de la PDE, permitiendo así que se reasocien con las subunidades catalíticas e inhiban la actividad de la PDE. Las mismas reacciones se dan en los conos, pero la subunidad catalítica de la PDE de los conos está formada por dos subunidades α catalíticas en lugar de las subunidades α y β presentes en los bastones.

La concentración de cGMP está regulada por la concentración de Ca^{2+} intracelular. El calcio entra en los bastones en la oscuridad a través de los canales de sodio, aumentando su concentración hasta un orden de 500 nM. A estas concentraciones, la actividad de la **guanilato ciclasa** es baja. Cuando se cierran los canales de sodio, se inhibe la entrada de Ca^{2+}, pero la salida, mediada por el intercambiador de sodio/calcio–potasio, no cambia (complejo situado en la parte superior de la membrana plasmática en la Figura 23.25). Esto da como resultado una disminución en la concentración intracelular de Ca^{2+}, lo que, a su vez, activa la guanilato ciclasa e incrementa la producción de cGMP a partir de GTP.

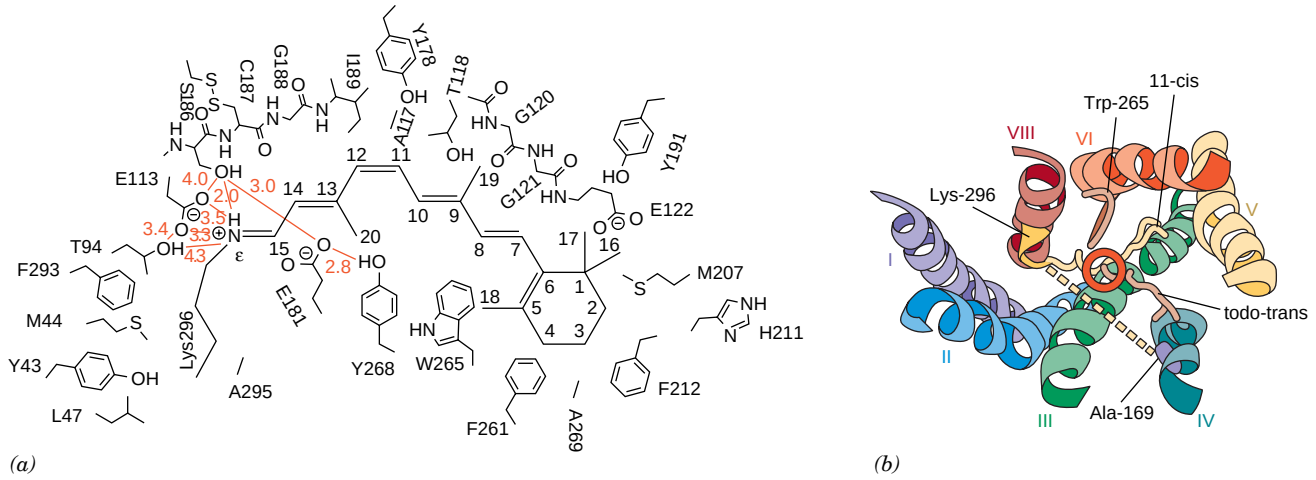


FIGURA 23.24
Esquema del 11-*cis*-retinal y su forma todo-*trans*.
(*a*) Cadenas laterales de los aminoácidos que rodean al 11-*cis*-retinal. Cuando el 11-*cis*-retinal isomeriza a la forma todo-*trans* (*b*), el anillo de β-ionona del todo-*trans*-retinal interacciona con Ala^{169} en la hélice IV.

Tomado con permiso de (a). Palczewski, K. et al. Science *289:739, 2000 y (b) Bourne, H. R. y Meng, E. C.* Science *289:733, 2000. Copyright © 2000 by American Association for the Advancement of Science.*

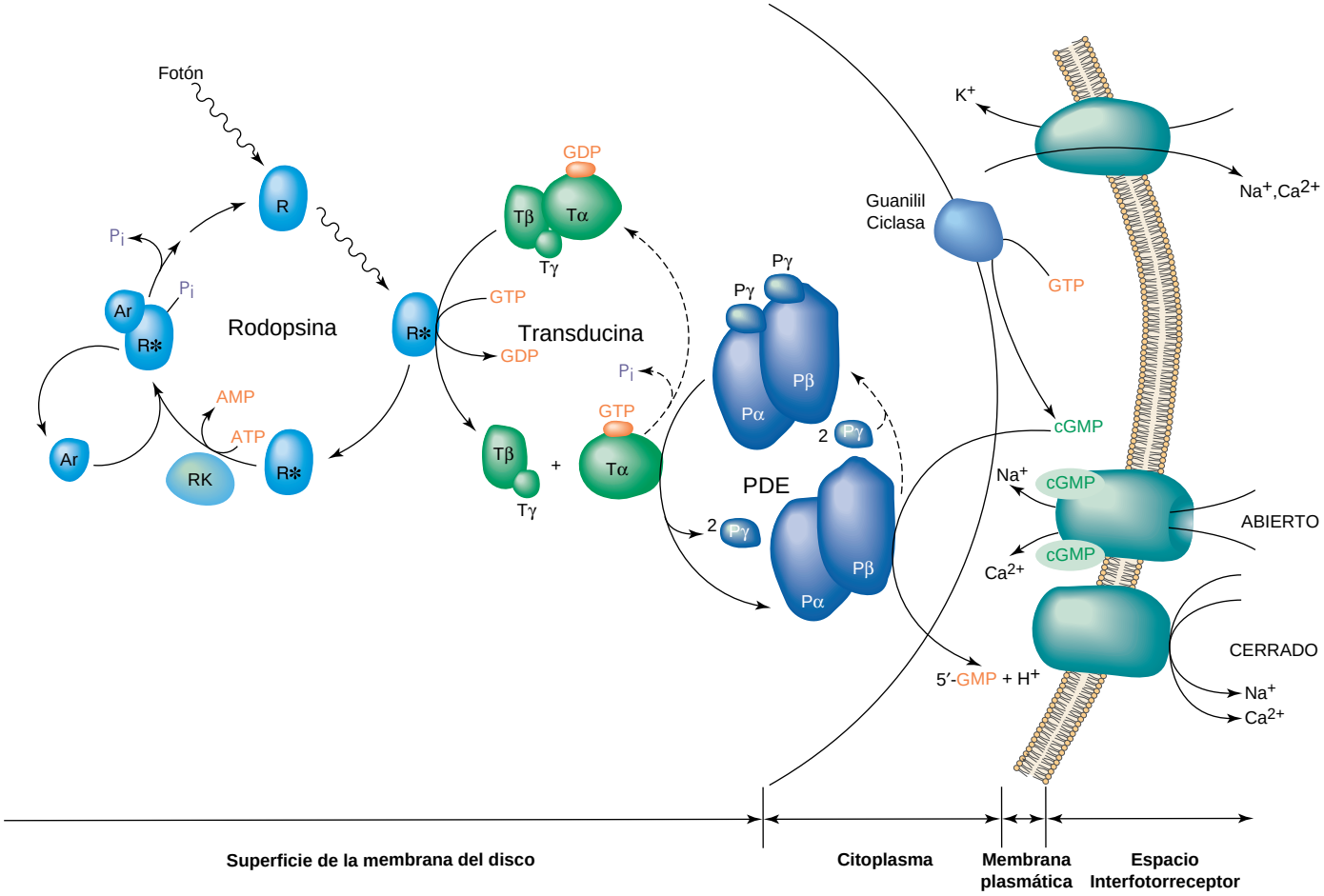


FIGURA 23.25
Cascada de reacciones bioquímicas implicadas en el ciclo de la visión.
Adaptado de Farber, D. B. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *36:263, 1995.*

Tanto la resíntesis de cGMP como la hidrólisis de T_{α}–GTP desempeñan papeles importantes en la terminación de las reacciones del ciclo de la visión. La inactivación de la rodopsina activada, R*, es también de gran importancia. La rodopsina activada, R*, es fosforilada por la **rodopsina quinasa** en presencia de ATP (Figura 23.25). La R*–P_i tiene una gran afinidad de unión por la proteína citosólica **arrestina**. El complejo arrestina–R*–P_i no es capaz ya de interaccionar con la transducina. La cinética de la unión de arrestina a la rodopsina activada fosforilada es suficientemente rápida *in vivo* para detener la cascada de reacciones.

La rodopsina se regenera a través de otra serie de reacciones y el ciclo puede empezar de nuevo por fotones de luz. En la Figura 23.23 se muestra que la serie de reacciones que conducen a la regeneración de la rodopsina incluyen la disociación del todo-*trans*-retinal de la metarrodopsina. La regeneración del 11-*cis*-retinal a partir de todo-*trans*-retinal se da a través de reacciones que se han descrito previamente y que ocurren antes de que éste sea utilizado de nuevo para generar rodopsina.

Algunas de las principales proteínas que intervienen en el ciclo de la visión aparecen en la Tabla 23.6. En prácticamente cualquiera de ellas pueden tener lugar mutaciones que causen problemas de visión. De hecho, una retinitis pigmentosa recesiva observada recientemente parece estar asociada con un gen humano que codifica una subunidad δ de cGMP también observada recientemente. La enfermedad se ha caracterizado como un metabolismo anormal del cGMP en la retina.

La visión del color reside en los conos

Aunque existen artistas de la fotografía, tales como el difunto Ansel Adams, que hacen bonita la visión del mundo en blanco y negro, la intervención de los colores en

TABLA 23.6 Proteínas principales de la cascada de la fototransducción

Proteína	*Relación con membrana*	*Masa molecular (kDa)*	*Concentración en citoplasma (μM)*
Rodopsina	Intrínseca	39	—
Transducina ($\alpha + \beta + \gamma$)	Periférica o soluble	80	500
Fosfodiesterasa	Periférica	200	150
Rodopsina quinasa	Soluble	65	5
Arrestina	Soluble	48	500
Guanilato ciclasa	Unida al citoesqueleto	?	?
Canal activado por cGMP	Intrínseca	66	?

el espectro de imágenes de lo vivo aporta otro grado de belleza a las maravillas de la naturaleza y de la vida . . . e incluso la posibilidad de distinguir distintos tejidos a partir de tinciones histológicas. Esta capacidad del hombre para distinguir colores reside en una parte relativamente pequeña del sistema visual: los conos. En el ojo humano, el número de conos es pequeño comparado con el número de bastones. Algunos animales, como los perros, tienen incluso un número menor de conos, y otros animales, como los pájaros, tienen muchos más.

El mecanismo general para la estimulación de los conos por la luz es exactamente el mismo que para las células bastón. Existen tres tipos de conos, definidos por el pigmento visual que contienen, azul, verde o rojo. También son denominados opsinas específicas para longitudes de onda cortas (S, *short*), medias (M) y largas (L), respectivamente. Normalmente sólo se da un tipo de pigmento en una misma célula. Sin embargo, durante el desarrollo fetal, pueden existir múltiples pigmentos en la misma célula. En estas condiciones, probablemente aparece primero el pigmento azul, seguido de los pigmentos verde y rojo. El número de conos que contienen múltiples pigmentos disminuye al nacer y prácticamente no hay ninguno en los adultos. El pigmento azul tiene un óptimo de absorbancia a 420 nm, el pigmento verde a 535 nm, y el pigmento rojo a 565 nm (Figura 23.21). Cada uno de estos pigmentos contiene 11-*cis*-retinal como grupo prostético y, cuando se activa por la luz, el 11-*cis*-retinal se isomeriza a todo-*trans*-retinal, como en los bastones. Los colores distintos a los de los pigmentos visuales se distinguen mediante la estimulación gradual de los diferentes conos y el análisis comparativo que hace el cerebro. La visión del color es **tricromática**.

La discriminación del color por los conos es una propiedad inherente de las proteínas de los pigmentos visuales a las que está unido el 11-*cis*-retinal. El 11-*cis*-retinal está unido a cada proteína a través de una base de Schiff protonada. El espectro de absorción producido por el sistema de dobles enlaces conjugados del 11-*cis*-retinal está influenciado por su entorno (Figura 23.21). Cuando el 11-*cis*-retinal se une a diferentes proteínas visuales, los residuos aminoácidos cercanos a la base protonada y al sistema de enlaces π conjugados influyen en los niveles energéticos y proporcionan diferentes espectros de absorción con máximos distintos para los diferentes pigmentos de color.

Se han clonado los genes de los pigmentos visuales y, a partir de las secuencias génicas, se han deducido las secuencias de aminoácidos. En la Figura 23.26 se muestra una comparación de estas secuencias. Los círculos blancos representan aminoácidos iguales, mientras que los círculos rojos representan aminoácidos diferentes. Una hilera de círculos rojos en cada extremo puede representar una extensión de la cadena de una proteína en relación con la otra. Los pigmentos verde y rojo muestran el mayor grado de homología, aproximadamente el 96% de identidad, mientras que el grado de homología entre los diferentes pares de los otros pigmentos se sitúa entre el 40% y el 45%.

Los genes que codifican los pigmentos visuales se han identificado en cromosomas específicos (Apli. Clín. 23.6). El gen de la rodopsina se encuentra en el **cromosoma 3**, el gen que codifica el pigmento azul está en el **cromosoma 7** y los dos genes para los pigmentos rojo y verde en el **cromosoma X**. A pesar de su gran si-

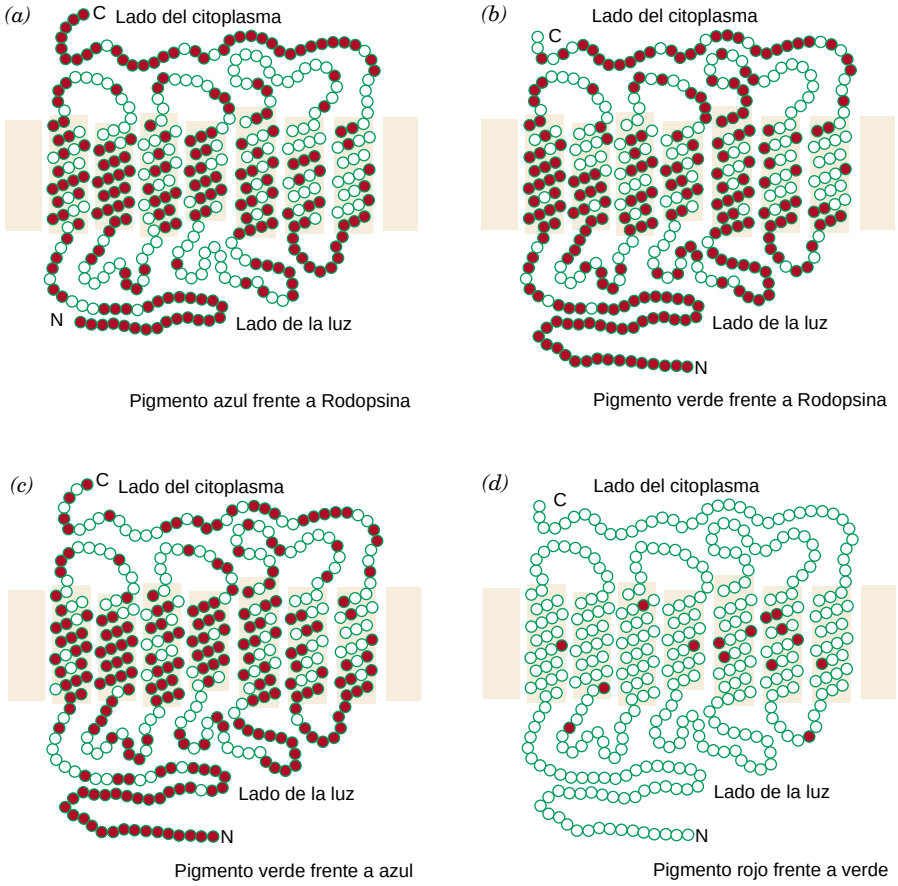
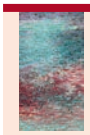


FIGURA 23.26
Comparación de las secuencias de aminoácidos de los pigmentos visuales humanos.
Cada punto rojo indica una diferencia de aminoácido.
Adaptado de Nathans, J. Annu. Rev. Neurosci. *10:163, 1987.*



APLICACIÓN CLÍNICA 23.6
Localización cromosómica de los genes para la visión

La disposición cromosómica de los genes de la visión impide que la herencia de un solo gen defectuoso procedente de un progenitor pueda convertir en invidente al receptor. Todos los genes para la expresión de los pigmentos visuales se encuentran en cromosomas que existen en pares excepto en los varones, en los que existe un único cromosoma X que contiene los genes de los pigmentos rojo y verde. En hembras existen un par de cromosomas X, y por consiguiente, en ellas son raras las anomalías del color, que afectan únicamente a aproximadamente un 0,5% de la población. Por el contrario, alrededor del 8% de los varones presentan una visión del color anormal que afecta a la percepción del rojo o del verde, e incluso, en raras ocasiones, a ambos. Para simplificar, a las proteínas codificadas por los diferentes genes se las denomina pigmentos, a pesar de que se convierten en pigmentos visuales sólo cuando forman complejos con el 11-*cis*-retinal.

El gen que codifica la parte proteica de la rodopsina, el pigmento de los bastones, se localiza en el tercer cromosoma. Los genes que codifican las tres proteínas de los pigmentos presentes en los conos se localizan en dos cromosomas distintos. El gen para el pigmento azul está en el séptimo cromosoma. Los genes para los pigmentos rojo y verde están estrechamente ligados y se localizan en el cromosoma X, que normalmente contiene un gen para el pigmento rojo y de uno a tres genes para el verde. En un conjunto de conos determinado, sólo se expresa uno de estos tipos génicos, que son, o bien para el pigmento rojo, o bien uno de los genes para el pigmento verde. Mutaciones genéticas pueden causar anomalías estructurales en las proteínas que influyen en la unión del retinal o en el entorno en el que reside el retinal. Además, puede no expresarse el gen de la proteína de un determinado pigmento. Si no se une el 11-*cis*-retinal, o no se expresa una de las proteínas, el individuo poseerá visión del color dicromática y será ciego para el color del pigmento ausente. Si la mutación provoca en el entorno alrededor del 11-*cis*-retinal un cambio que, a su vez, causa una desviación del espectro de absorción del pigmento, el individuo presentará una visión del color tricromática anormal, es decir, presentará grados diferentes de estimulación en los tres pigmentos del cono, lo que dará como resultado una integración diferente de la señal y, por tanto, una interpretación diferente del color.

Vollrath, D., Nathans, J. y Davis, R. W. Tandem array of human visual pigment genes at X. 28. *Science* 240:1669, 1988; y Nathans, J. In the eye of the beholder: visual pigments and inherited variations in human vision. *Cell* 78:357, 1994.

militud, los pigmentos verde y rojo son proteínas claramente distintas. Se han identificado individuos con alteraciones hereditarias que afectan a uno de ellos, pero no a ambos pigmentos simultáneamente. Además, puede existir más de un gen para el pigmento verde, si bien parece que sólo se expresa uno de ellos.

John Dalton (1766–1844), que desarrolló la teoría atómica de la química, sufría ceguera para los colores. El creía que su problema se debía a que el humor vítreo estaba teñido de azul, por lo que absorbía de forma selectiva las longitudes de onda más largas de la luz. Dejó instrucciones para que después de su muerte sus ojos pudieran ser examinados para determinar si su teoría era correcta. Una autopsia reveló que su humor vítreo era "perfectamente transparente", normal. Mediante análisis de DNA efectuados en sus ojos conservados en el Museo Británico, se ha podido demostrar que Dalton no poseía pigmento azul. Así, en lugar de la visión tricromática, él poseía un tipo de visión dicromática denominada **deuteranopía**. El tipo de ceguera para los colores en la que falta el pigmento verde recibe el nombre de **protanopía**.

Otras diferencias físicas y químicas entre conos y bastones

La sensibilidad y el tiempo de respuesta de los bastones son distintas de las de los conos. La absorción de un único fotón por los fotorreceptores de los bastones genera una corriente de aproximadamente 1 a 3 pA ($1–3 \times 10^{-12}$ A), mientras que el mismo fenómeno genera en los conos una corriente de aproximadamente 10 fA (10×10^{-15} A), alrededor de 1/100 de la respuesta en los bastones. Sin embargo, el tiempo de respuesta de los conos es unas cuatro veces más rápido que en los bastones. Por consiguiente, los conos son más adecuados para discernir acontecimientos que cambien con rapidez, y los bastones son mejores para la sensibilidad visual en condiciones de luz escasa.

23.4 | CONTRACCIÓN MUSCULAR

Para la contracción muscular se propuso el **modelo del filamento deslizante** en base a un análisis exhaustivo de micrografías electrónicas del tejido del músculo esquelético. Este modelo simple pero explicativo ha resistido la prueba del tiempo. Se han clonado los genes de muchas de las proteínas del tejido muscular y, a partir de las secuencias de sus moléculas de cDNA, se han deducido las secuencias de aminoácidos. Se han publicado también las estructuras tridimensionales de algunas de estas proteínas. Si bien no se han podido completar los detalles referentes a la contracción muscular, se está consiguiendo una mayor comprensión del proceso. En esta sección se tratarán algunos aspectos bioquímicos del mecanismo de la contracción muscular, con un mayor énfasis en el músculo esquelético que en el liso y el cardíaco. Algunos aspectos de la función del músculo cardíaco se trataran en las aplicaciones clínicas.

La contracción del músculo esquelético sigue una ruta eléctrica-química-mecánica

La señal para la contracción del músculo esquelético empieza con un impulso eléctrico desde un nervio. A esto sigue un cambio químico que se produce dentro de la célula unidad del músculo y, a continuación, una contracción, que es un proceso mecánico. De este modo, el proceso de **transducción de señal** pasa de ser eléctrico a ser químico, y de químico a mecánico.

En la Figura 23.27 se muestra un diagrama esquemático de la organización estructural del músculo esquelético. El músculo está formado por haces de fibras (diagrama *c*). Cada uno de estos haces se denomina fascículo (diagrama *b*). Las fibras están constituidas por miofibrillas (diagrama *d*), y cada miofibrilla es una serie continua de células musculares o de unidades denominadas **sarcómeros**. La célula muscular es multinucleada y ya no es capaz de dividirse. La mayor parte de las células musculares sobreviven durante la vida del animal, aunque pueden reemplazarse o alargarse mediante la fusión de **mioblastos**.

En la Figura 23.28 se muestra esquemáticamente una célula muscular. Obsérvese que las miofibrillas están rodeadas por una estructura membranosa denominada **retículo sarcoplasmático**. A intervalos discretos a lo largo de los haces de miofibrillas y conectadas a la cisterna terminal del retículo sarcoplasmático se en-

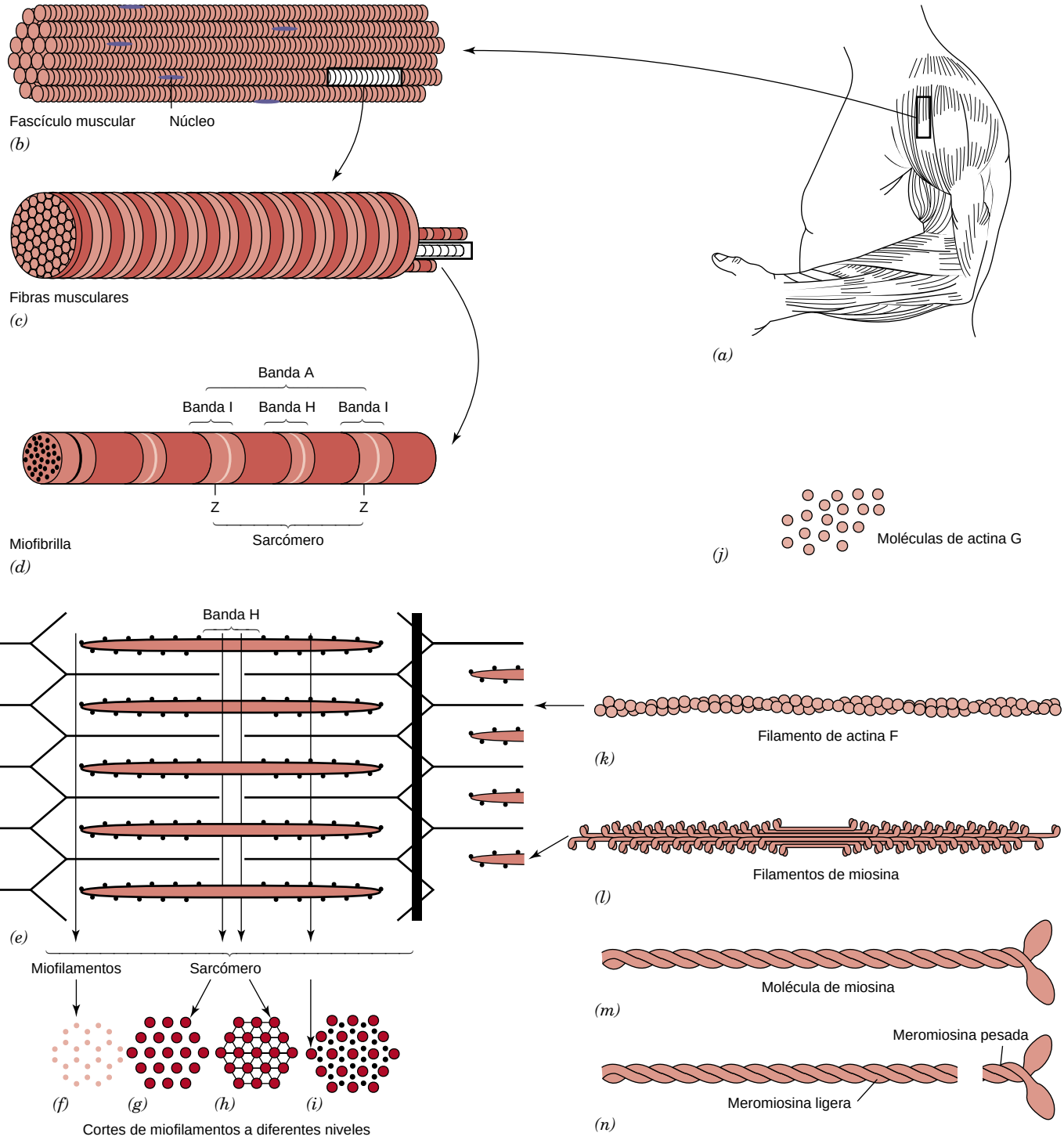


FIGURA 23.27
Organización estructural del músculo esquelético.
Tomado de Bloom, W. D. y Fawcett, D. W. Textbook of Histology, *10th ed. Philadelphia: Saunders, 1975.*

cuentran los túbulos transversales. Los túbulos transversales están conectados a la membrana plasmática externa que rodea toda la estructura. Los núcleos y las mitocondrias se hallan en la parte interior de la membrana plasmática.

La unidad contráctil individual, el sarcómero, se extiende de una línea Z a la siguiente (Figuras 23.27*d* y 23.28). Las bandas que se observan en el sarcómero se deben a la disposición de proteínas específicas (Figura 23.27*e*). Se observan dos tipos de fibras: unas largas y gruesas que se sitúan cerca del centro del sarcómero y

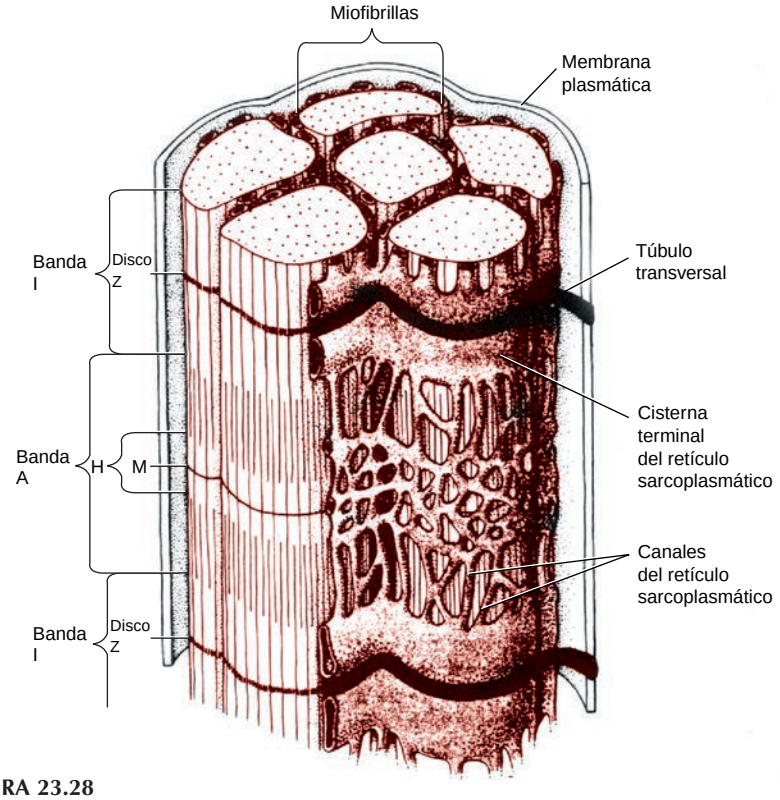


FIGURA 23.28
Esquema de un haz de seis miofibrillas.
La luz de los túbulos transversales está en contacto con el medio extracelular y penetra en las fibras a nivel del disco Z.
Tomado con permiso de Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. Molecular Cell Biology. *New York: Scientific American Books, 1986, p. 827.*

que presentan protuberancias en ambos extremos, y otras largas y delgadas que están unidas a la **línea Z**. La **banda I (isotrópica)** se prolonga en una distancia corta a ambos lados de la línea Z. Esta región contiene solamente **filamentos delgados,** unidos a una banda proteica dentro de la línea Z. La **banda H** está en el centro del sarcómero. Dentro de esta región no hay filamentos delgados. En el medio de la banda H se encuentra una banda algo difusa que se debe a la presencia de otras proteínas que colaboran en el entrecruzamiento de las fibras de los **filamentos gruesos** (Figura 23.27, modelo *h*). La **banda A (anisotrópica)** está situada entre los bordes internos de las bandas I. Cuando se contrae el músculo, las bandas I y H se acortan, pero la distancia entre la línea Z y el borde próximo de la banda H permanece constante. También permanece constante la distancia entre los bordes más internos de las bandas I situadas a ambos extremos del sarcómero. Esto se produce porque ni los filamentos delgados ni los filamentos gruesos cambian de longitud durante la contracción. Por lo tanto, la contracción tiene lugar cuando estos filamentos "se deslizan" unos por delante de los otros.

Los elementos contráctiles, los sarcómeros, están constituidos por muchas proteínas diferentes, ocho de las cuales aparecen en la lista de la Tabla 23.7. La miosina y la actina son las dos más abundantes. Aproximadamente el 60–70% de la proteína del músculo es miosina, y un 20–25% es actina. El filamento grueso es principalmente miosina y el filamento delgado actina. Tres de las otras proteínas de la lista incluidas en la Tabla 23.7 también están asociadas con los filamentos delgados, y dos lo están con los filamentos gruesos. (Véase también Apli. Clín. 23.7 en relación a las proteínas relacionadas con el músculo cardíaco.)

El filamento grueso del músculo es miosina

En la Figura 23.29*b* se muestra un dibujo esquemático de la molécula de miosina, que es una representación de las micrografías electrónicas mostradas en la Figura 23.29*a*.

La miosina es una molécula larga y fibrosa con dos cabezas globulares en uno de sus extremos. Está compuesta por dos cadenas pesadas de aproximadamente 230 kDa cada una. Unidas a cada una de las cadenas pesadas, cerca del grupo de la cabeza, existen un par desigual de cadenas ligeras, cada una de ellas de aproximadamente 20 kDa. Las cadenas ligeras son proteínas "de tipo calmodulina" que unen calcio. *In vitro* se puede eliminar una de estas cadenas ligeras de cada molécula de miosina sin afectar la capacidad de la miosina de funcionar en el proceso de contracción.

El extremo carboxilo de cada cadena de miosina está localizado en la sección de la cola. Las colas de las dos cadenas pesadas se enrollan entre sí en una disposición espiral-espiral (Figura 23.29*b*). La **tripsina** corta la sección de la cola a aproximadamente un tercio de su longitud desde la cabeza, produciendo **meromiosina pesada** (el grupo de la cabeza y una cola corta) y **meromiosina ligera** (el resto de la sección de la cola). En condiciones fisiológicas simuladas, sólo la meromiosina ligera posee la capacidad de agregarse, lo que sugiere que la agregación es una de sus funciones en la formación de la cadena pesada *in vivo*. Mediante tratamiento con **papaína**, la sección de la cabeza puede asimismo separarse del resto de la sección de la cola. El grupo de cabeza de la miosina que se obtiene mediante este corte se denomina **subfragmento 1** o **S-1**. La acción de estas proteasas demuestra también que la molécula presenta al menos dos puntos de bisagra cerca de la unión cabeza–cola (Figura 23.29*b*).

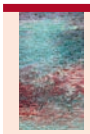
Se han clonado los cDNA de la miosina de muchas especies diferentes y de diferentes tipos de músculo y a partir de ahí se han deducido las secuencias de aminoácidos de las diferentes moléculas de miosina. La miosina ha evolucionado muy lentamente. Esiste un grado de homología muy elevado entre miosinas obtenidas de diferentes orígenes, especialmente en la región de la cabeza o globular. Aunque la homología de secuencia es algo menor en la región de la cola, la homología funcional todavía persiste hasta un grado extraordinariamente elevado, a pesar de que su longitud varía aproximadamente desde 86 hasta 150 nm según las diferentes especies. En los mamíferos, el grupo de cabeza de la miosina contiene cerca de la mitad de los aminoácidos de la molécula (de aproximadamente 839 hasta aproximadamente 850).

La miosina forma un **agregado simétrico cola-cola** alrededor de la línea M de la zona H del sarcómero. Sus secciones de cola se alinean de forma paralela a ambos lados de la línea M con los grupos de las cabezas, apuntando hacia la línea Z. Cada filamento grueso contiene alrededor de de 400 moléculas de miosina. La proteína C (Tabla 23.7) interviene en su unión. La proteína M también interviene, probablemente para mantener juntas las secciones de la cola así como para anclarlas a la línea M de la zona H.

La sección de la cabeza globular de la miosina contiene la actividad **ATPasa** que proporciona la energía para la contracción, y contiene además el **sitio de unión de la actina**. El fragmento S-1 contiene también los sitios de unión de las **cadenas ligeras esencial** y **reguladora**. El modelo espacial de la estructura tridimensional del fragmento S-1 de la miosina se muestra en la Figura 23.30. La región de unión a la actina se encuentra en la zona inferior derecha de la molécula, donde se puede

TABLA 23.7 Masa molecular aproximada de las proteínas contráctiles del músculo esquelético

Miosina	500 000
Cadena pesada	200 000
Cadena ligera	20 000
Monómero de actina (actina G)	42 000
Tropomiosina	70 000
Troponina	76 000
Subunidad Tn-C	18 000
Subunidad Tn-I	23 000
Subunidad Tn-T	37 000
Actinina α	200 000
Proteína C	150 000
Actinina β	60 000
Proteína M	100 000



APLICACIÓN CLÍNICA 23.7

Cardiomiopatías hipertróficas familiares y mutaciones en las proteínas del músculo

Las cardiomiopatías hipertróficas están caracterizadas por un agrandamiento/ensanchamiento del ventrículo izquierdo o derecho. Esta patología puede causar arritmias y muerte prematura. Se ha observado, hasta la fecha, que la cardiomiopatía hipertrófica familiar está causada por mutaciones que involucran siete genes diferentes que codifican algunas de las proteínas listadas en la Tabla 23.7. Estas proteínas son la cadena pesada de la miosina-β, la cadena ligera reguladora de la miosina ventricular, la troponina T cardíaca, la troponina I cardíaca, la tropomiosina-α, y la proteína C de unión a la miosina cardíaca. Algunos de estos genes expresan diferentes isoformas de sus proteínas que pueden expresarse solamente en el tejido cardíaco. Así, alguno de los efectos cardíacos citados no son generalmente aplicables a otros tipos de músculo. Mutaciones en los genes que codifican cada una de estas proteínas pueden alterar la estructura y función del sarcómero y causar así una alteración de la función cardíaca. La alteración en la función cardíaca puede incluir la disminución de la fuerza generada por la interacción miosina-actina, el anclaje defectuoso de la miosina (proteína C) en el sarcómero, y la interferencia con cualquiera del resto de funciones normales de las subunidades de la tropomiosina y la troponina. Estas anomalías genéticas conducen a la producción de proteínas anómalas y a una estructura y función anómala de los miocitos. En la referencia citada a continuación se dan representaciones esquemáticas de las estructuras genómicas y proteicas de estos mutantes.

Bonne, C., Carrier, L., Pascal, R., Hainque, B. y Schwartz, K. Familial hypertropic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ. Res.* 83:580, 1998.

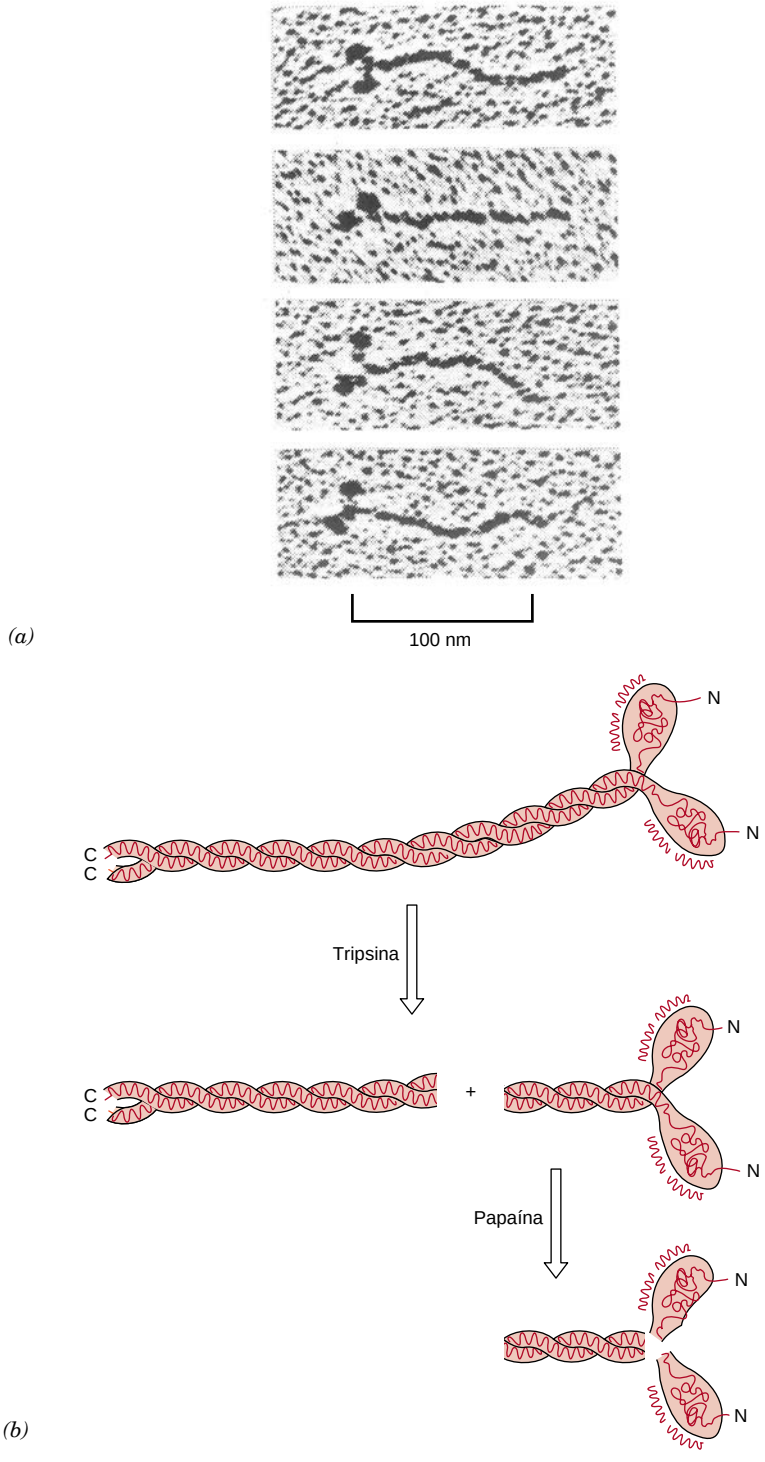


FIGURA 23.29
(*a*) Micrografías electrónicas de la molécula de miosina. (*b*) Esquema de una molécula de miosina.
El dibujo muestra las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras de la miosina. También se muestra la posición aproximada de los cortes por tripsina y papaína.
Tomado con permiso de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. Molecular Biology of the Cell, *2nd ed. New York: Garland Publishing, 1983.*

observar la hendidura que apunta hacia la región del sitio activo donde se une el ATP. Los dominios de 25, 50 y 20 kDa de la cadena pesada se indican en verde, rojo y azul, respectivamente. La cadena ligera esencial (ELC) y la cadena ligera reguladora (RLC) aparecen, respectivamente, en amarillo y magenta.

El sitio de unión al ATP es también una hendidura abierta de unos 13 Å de profundidad y unos 13 Å de anchura. Está separado unos 35 Å del sitio de unión a la actina. La miosina se une a la actina de forma estereoespecífica. ELC y RLC se asocian con una única hélice larga que conecta las regiones de la cabeza y la cola. Entre la ELC y la hélice de conexión queda espacio para una cierta flexibilidad. ¡La conformación de la miosina con ATP unido tiene una afinidad por la actina que es

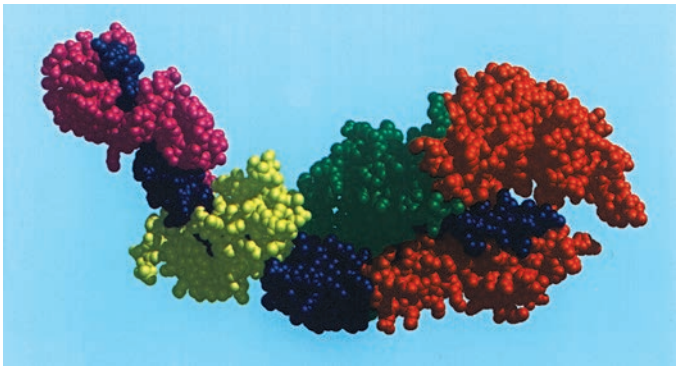


FIGURA 23.30
Modelo espacial de los residuos aminoácidos del fragmento S-1 de la miosina.
Los dominios de 25, 50 y 20 kDa de las dos cadenas pesadas se indican en verde, rojo y azul, respectivamente. Las cadenas ligeras esencial y reguladora son, respectivamente, amarilla y magenta.
Tomado con permiso de Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., et. al. Science 261:50, 1993. Copyright © 1993 by American Association for the Advancement of Science.

1/10 000 de la que tiene la conformación de la miosina sin ATP unido! Por lo tanto, la transducción de energía química a trabajo mecánico depende en primera instancia de cambios en la conformación de proteínas que tienen lugar tras la unión del ATP, su hidrólisis y la disociación del producto.

La actina, la tropomiosina y la troponina son proteínas del filamento delgado

La **actina** es una proteína mayoritaria del filamento delgado y constituye aproximadamente el 20– 25% de la proteína muscular. Se sintetiza como una proteína globular de 42 kDa. Su secuencia de aminoácidos está conservada en más de un 90% entre diferentes especies. Esto se muestra en la Tabla 23.8 para las actinas de músculo esquelético, las de músculo liso y las de músculo cardíaco en tres especies. Las diferencias se observan como máximo en unas siete posiciones diferentes. Las secuencias de aminoácidos de más de 30 isotipos diferentes de actina, la más larga de ellas de 375 aminoácidos, ponen de manifiesto que en cualquiera de ellas se ha sustituido un máximo de únicamente 32 residuos (véase Apli. Clín. 23.8). Un número significativo de estas sustituciones se encuentra en el N-terminal, lo que podría predecirse si se considera que todas las moléculas de actina sufren modificación postraducción en el N-terminal. La metionina N-terminal se acetila y se elimina, y el aminoácido siguiente se acetila. El proceso puede finalizar en este punto, o puede repetirse una o dos veces. En todos los casos el aminoácido N-terminal es acetilado.

La actina se sintetiza inicialmente en una forma globular denominada actina G. En la Figura 23.31 se muestra una representación de su estructura. La actina tiene dos dominios distintos de aproximadamente igual tamaño que, históricamente, se han designado como dominio grande (izquierda) y pequeño (derecha). Cada uno de estos dominios está formado por dos subdominios. Tanto el residuo N-terminal como el C-terminal se encuentran dentro del subdominio 1 del dominio pequeño. La molécula posee polaridad, y cuando se agrega para formar **actina F**, o actina fibrosa, lo hace con una direccionalidad específica. Esto es importante para los procesos de "juntar y estirar" implicados en el acortamiento del sarcómero durante la contracción muscular.

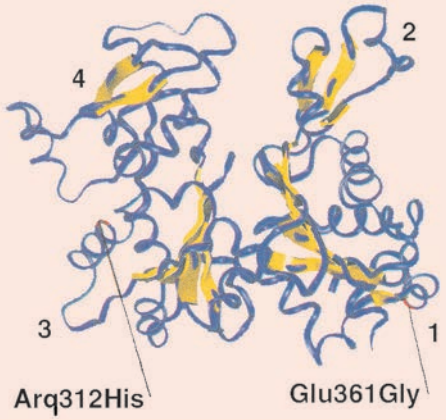
TABLA 23.8 Resumen de las diferencias de aminoácidos entre actina de músculo liso de molleja de pollo, actina de músculo esquelético y actina cardíaca bovina

	Residuo número						
Tipo de actina	*1*	*2*	*3*	*17*	*89*	*298*	*357*
Músculo esquelético[a]	Asp	Glu	Asp	Val	Thr	Met	Thr
Músculo cardíaco[b]		Asp	Glu			Leu	Ser
Músculo liso[c]	Ausente		Glu	Cys	Ser	Leu	Ser

Fuente: Adaptado de Vandekerckhove, J. y Weber, K. *FEBS Lett.* 102:219, 1979.
[a]De músculo esquelético de pollo, bovino y de conejo.
[b]De corazón bovino.
[c]De molleja de pollo.

APLICACIÓN CLÍNICA 23.8
Mutaciones en la actina y cardiomiopatía dilatada

La cardiomiopatía dilatada se caracteriza por paredes finas del corazón con una incapacidad de bombear la sangre de forma eficiente. Una causa genética de esta patología puede ser una actina defectuosa. La secuencia de aminoácidos de la actina está altamente conservada. Existen diversas isoformas de la actina que resultan de la expresión de diferentes genes; cinco de los seis conocidos se expresan en los miocitos esqueléticos y cardíacos. En los miocitos cardíacos de los adultos, aproximadamente el 80% de la actina deriva de la expresión de isoformas cardíacas específicas. Mutaciones en las regiones invariantes de estas isoformas cardíacas pueden tener como consecuencia graves efectos sobre la salud. Se ha demostrado que una sustitución puntual de un aminoácido heredada, A312H, en un paciente y Q361G en otro paciente, casusaban cardiomiopatía dilatada, una patología en que el único tratamiento definitivo para un estado avanzado es el trasplante de corazón. Las posiciones de estas mutaciones en la estructura terciaria de la actina-G se muestran en la siguiente figura.



Representación esquemática del monómero de actina cardíaca y la localización de mutaciones idiopáticas de la cardiomiopatía dilatada.
De Olson et al. (1998).

La comparación de las posiciones de estas sustituciones con la estructura de la actina mostrada en la Figura 23.31 muestra que tienen lugar en dos regiones funcionales diferentes de la actina.

Olson, T. M., Michels, V. V., Thibodeau, S. N., Tai, Y-S. y Keating, M. T. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 280:750, 1998. Copyright © 1998 by American Association for the Advancement of Science.

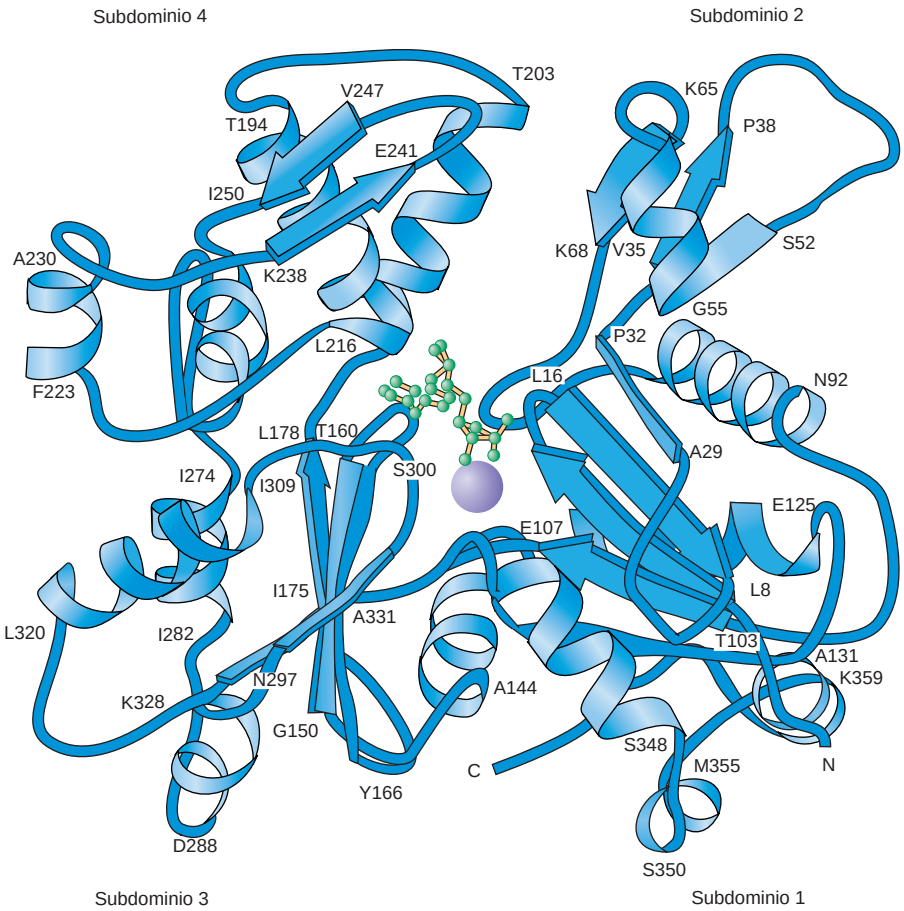


FIGURA 23.31
Elementos de estructura secundaria en la estructura cristalina de la actina G.
El ADP y el ion metálico se muestran ocupando la hendidura entre los dos dominios mayores.
Tomado con permiso de Lorenz, M., Popp, D. y Holmes, K. C. J. Mol. Biol. 234:826, 1993 con permiso del editor, Academic Press Limited, London.

La actina G contiene un sitio de unión específico, situado entre los dos dominios mayores, para ATP y para un ion metálico divalente. El ion Mg^{2+} es con mayor probabilidad, el catión fisiológicamente importante, pero el Ca^{2+} también se une fuertemente y compite con el Mg^{2+} por el mismo sitio de unión. El **complejo actina G–ATP–Mg^{2+}** agrega para formar el **polímero de actina F** (Figura 23.35*a*). La agregación puede producirse desde ambas direcciones, si bien los datos cinéticos indican que la dirección de agregación preferida es por extensión desde el extremo mayor de la molécula, en el que la velocidad está controlada por difusión. La hidrólisis del ATP es varios órdenes de magnitud más rápida en la actina agregada que en el monómero. El complejo actina G–ADP– Mg^{2+} también se agrega para formar actina-F, aunque a una velocidad más lenta. La orientación de las moléculas de actina G en la actina F es tal que los subdominios 1 y 2 se encuentran al exterior en donde se encuentran los sitios de unión de la miosina. La actina F se puede interpretar como (1) una hélice levógira monocatenaria de inicio único en la que los monómeros giran unos 166° con un incremento de 27,5 Å o (2) una hélice dextrógira bicatenaria de inicio doble con medio paso de rosca de 350–380 Å.

Diversas proteínas citosólicas pueden unirse a la actina. La **actinina-β** se une a la actina F y juega un papel fundamental en la limitación de la longitud del filamento delgado. La **actinina α**, una proteína homodimérica, con dos subunidades de 90–110 kDa cada una, se une a monómeros adyacentes de actina F en las posiciones 86–117 y 350–375, fortaleciendo la fibra. También contribuye a anclar el filamento de actina a la línea Z del sarcómero. Las dos proteínas mayoritarias asociadas con el filamento delgado son la tropomiosina y la troponina.

La **tropomiosina** es una proteína en forma de bastón constituida por dos subunidades distintas, de unos 35 kDa cada una. Forma agregados que adoptan una configuración cabeza-cola. Esta proteína polimerizada interacciona de un modo flexible con el filamento delgado a lo largo de toda su longitud. La tropomiosina encaja dentro de los surcos de la disposición helicoidal de monómeros de actina de la actina F. Cada molécula de tropomiosina interacciona con aproximadamente siete monómeros de actina, entre los subdominios 1 y 3 de ésta. La tropomiosina contribuye a la estabilización del filamento delgado, así como a la transmisión de señales a otros componentes del filamento delgado necesarias para su cambio conformacional, tras la unión de Ca^{2+}. Unida a cada molécula de tropomiosina se encuentra una molécula de troponina.

La **troponina** está constituida por tres subunidades desiguales denominadas Tn-C, Tn-I y Tn-T, con masas moleculares de aproximadamente 18, 21 y 37 kDa, respectivamente. La subunidad Tn-T se une a la tropomiosina. La subunidad Tn-I está involucrada en la inhibición de la unión de la actina a la miosina en ausencia de Ca^{2+}. La subunidad Tn-C, una proteína similar a la calmodulina, une calcio e induce un cambio conformacional de la Tn-I y la tropomiosina, dando como resultado la exposición de los sitios de unión actina–miosina.

La estructura tridimensional de la Tn-C muestra que es un molécula en forma de pesas de gimnasia muy parecida a la calmodulina. En la Figura 23.32 se muestra un modelo estructural del complejo Tn-C–Tn-I saturado con calcio. La subunidad Tn-I

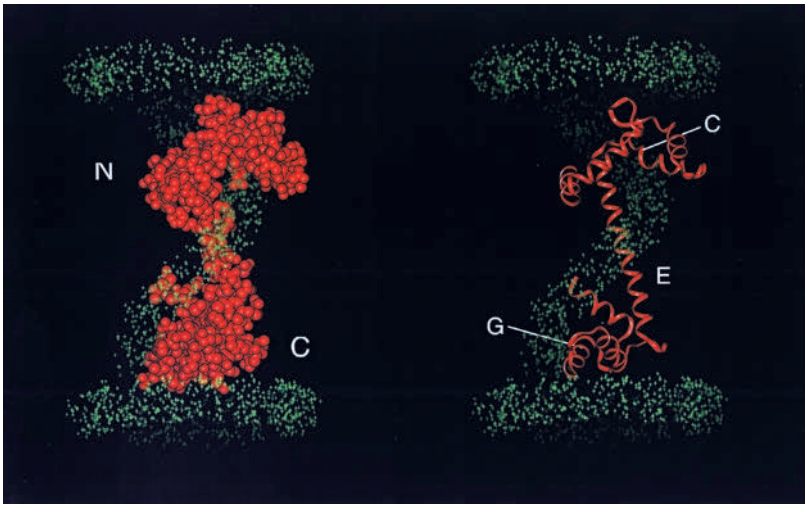
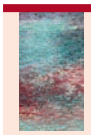


FIGURA 23.32
Modelo "de máximo encaje" para el complejo $4Ca^{2+}$–Tn-C–Tn-I.
Modelo del complejo de $4Ca^{2+}$–Tn-C–Tn-I, basado en estudios de dispersión de neutrones con marcaje de deuterio y variación de contraste (C. C. Olah y J. Trewhella. *Biochemistry* 33:12800, 1994). (Derecha) Vista mostrando la espiral de la Tn-I (cruces verdes) enrollándose alrededor de la $4Ca^{2+}$–Tn-C, representada por el esqueleto de carbonos α (cinta roja) en el que se indican las hélices C, E y G. (Izquierda) La misma vista con $4Ca^{2+}$–Tn-C representada como modelo CPK. *Fotografía proporcionada generosamente por el Dr. J. Trewhella. El editor reconoce que el gobierno de los EE.UU. posee la licencia no exclusiva y libre de royalties para publicar o reproducir la forma publicada de esta contribución, o para permitir a terceros que lo hagan, según propósitos del gobierno de los EE.UU.*



APLICACIÓN CLÍNICA 23.9
Subunidades de troponina como marcadores del infarto de miocardio

La troponina tiene tres subunidades (Tn-T, Tn-I y Tn-C), cada una de las cuales se expresa a partir de más de un gen. La Tn-I del músculo esquelético está codificada por dos genes, uno en el músculo esquelético rápido y uno en el lento; un gen codifica la Tn-I del músculo cardíaco. Los genes que codifican la Tn-T tienen el mismo patrón de distribución. Difieren en que el gen de la Tn-I del músculo esquelético lento también se expresa en el tejido cardíaco fetal. El gen de la forma cardíaca de la Tn-I parece ser específico para este tejido. Dos genes codifican la Tn-C, pero ninguno de ellos parece expresarse sólo en el tejido cardíaco.

La forma cardíaca de Tn-I en el hombre tiene 31 aminoácidos más que la forma del músculo esquelético, lo cual facilita su diferenciación de las otras. Los niveles séricos de Tn-I aumentan durante las cuatro horas siguientes a un infarto de miocardio agudo, y permanecen altos durante unos siete días en el 68% de los pacientes estudiados. Cerca de un 25% de uno de los grupos de pacientes en los que se realizó la prueba, también mostraron un ligero incremento de la forma cardíaca de Tn-I tras sufrir daños agudos del músculo esquelético. Esta podría ser una buena prueba, aunque no muy sensible, para detectar el infarto de miocardio.

En el tejido cardíaco humano adulto se encuentran dos isoformas de la Tn-T cardíaca, la Tn-T_1 y la Tn-T_2. En el tejido cardíaco fetal se encuentran también dos isoformas adicionales. Se especula que las isoformas pueden ser el resultado de un corte y empalme alternativo del mRNA. Los niveles séricos de Tn-T_2 aumentan durante las cuatro horas posteriores a un infarto de miocardio agudo y permanecen elevados hasta 14 días. La aparición de Tn-T_2 en el suero es un 100% sensible y un 95% específica para la detección del infarto de miocardio. En los EE.UU. la FDA ha dado su aprobación para la comercialización del primer ensayo de la Tn-T para el infarto de miocardio agudo. Los infartos de miocardio pueden ser no diagnosticados o diagnosticados de forma errónea en pacientes de hospitales que son ingresados por otras causas, o en 5 millones o más de personas que acuden al médico a causa de episodios de dolor torácico. Se cree que esta prueba será lo suficientemente específica para diagnosticar incidentes miocárdicos y para ayudar a los médicos a escoger el tratamiento adecuado para estos pacientes.

Anderson, P. A. W., Malouf, N. N., Oakeley, A. E., Pagani, E.D. y Allen, P.D. Troponin T isoform expression in humans. *Circ. Res.* 69:1226, 1991; y Ottlinger, M. E. y Sacks, D. B. *Clin. Lab. News,* 33, 1994.

se acomoda alrededor de la región central de la Tn-C adoptando una conformación de ovillo helicoidal y formando unos casquetes sobre ella en ambos extremos. Las regiones "casquete" de la Tn-I se encuentran en estrecho contacto con la Tn-C cuando ésta está completamente saturada con Ca^{2+}. La Tn-C tiene cuatro sitios de unión a iones metálicos divalentes. Dos de ellos están localizados en la región C-terminal y tienen una gran afinidad por los iones calcio (K_D alrededor de 10^{-7} M). Estos dos sitios de unión se encuentran presumiblemente siempre ocupados por iones metálicos divalentes (Ca^{2+} o Mg^{2+}) ya que las concentraciones de estos iones en la célula en reposo son del mismo orden de magnitud que la K_D. En estas condiciones, Tn-I posee una conformación que permite su interacción con los sitios de unión de la actina, inhibe la unión de la miosina e impide la contracción. Tras la excitación, la concentración de iones calcio aumenta a cerca de 10^{-5} M, valor lo suficientemente elevado para causar la unión de calcio a los sitios de la región N-terminal de la Tn-C. La Tn-I se une entonces a la Tn-C de forma preferente adoptando una conformación estructural con casquetes, tal como se muestra en la Figura 23.32. Los sitios de unión a la miosina en la actina quedan ahora expuestos. La relativamente poco rígida interacción de la tropomiosina con la actina le proporciona la suficiente flexibilidad para alterar su conformación en función de la concentración de iones calcio, y para colaborar en el bloqueo de los sitios de unión a la miosina de la actina. (Véase Apli. Clín. 23.9 para obtener información adicional acerca de la troponina.)

La Figura 23.27*i* presenta un esquema de una sección transversal del sarcómero y de la disposición relativa de los filamentos gruesos y delgados. Hay seis filamentos

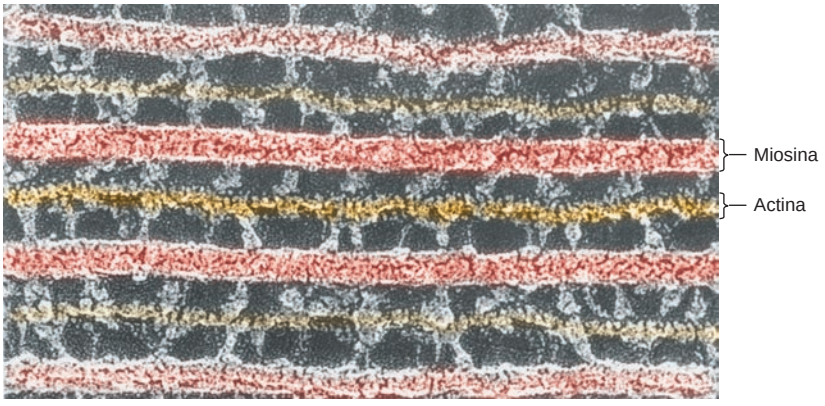
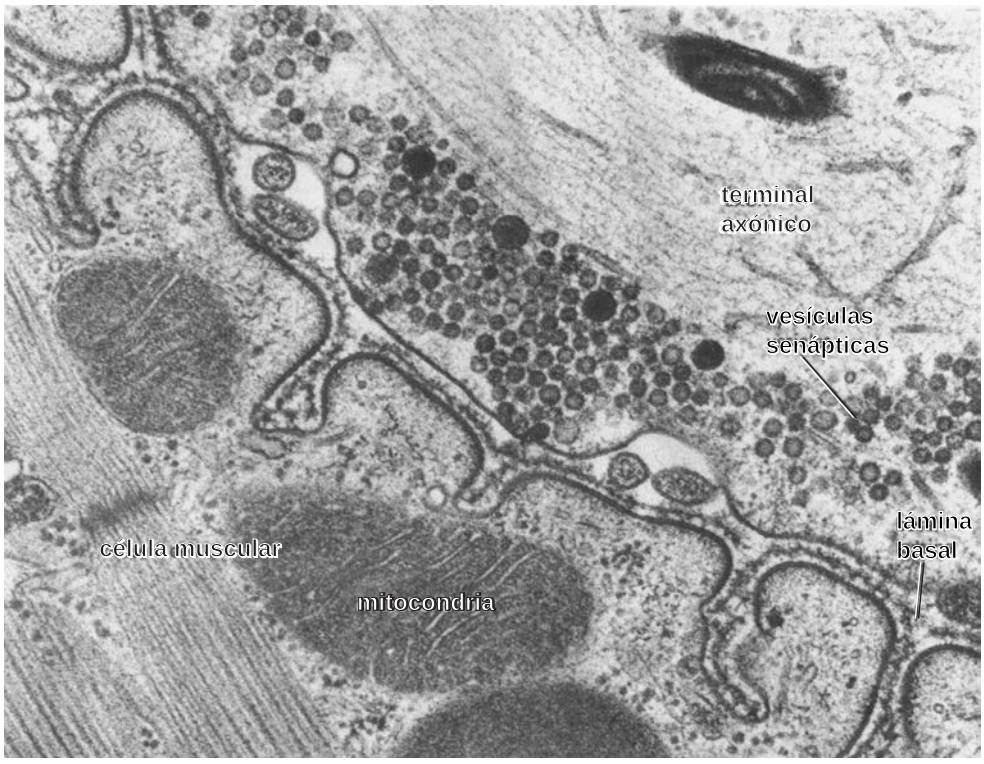


FIGURA 23.33
Micrografía electrónica coloreada de entrecruzamientos actina–miosina en un músculo estriado de insecto volador.
Reproducido con permiso de Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. Molecular Cell Biology. *New York: Scientific American Books, 1986.*

delgados alrededor de cada filamento grueso. La disposición y flexibilidad de los grupos de cabeza de la miosina permite que cada filamento grueso pueda interaccionar con múltiples filamentos delgados. Cuando se forman puentes cruzados entre los filamentos gruesos y delgados, éstos pueden formarse según modelos acordes con los que se muestran en la micrografía electrónica coloreada de la Figura 23.33. Esta figura muestra una imagen bidimensional de un filamento grueso interaccionando con los filamentos delgados situados a ambos lados de éste. Se producen interacciones similares de la miosina con la actina de los otros cuatro filamentos que lo rodean.

La contracción muscular requiere Ca^{2+}

La contracción del músculo esquelético se inicia mediante la transmisión de un impulso nervioso a través de la **unión neuromuscular**, por medio de la liberación del neurotransmisor **acetilcolina** en la hendidura sináptica. Los **receptores de acetilcolina** están asociados a la membrana plasmática y tienen apertura regulada por ligando. La unión de la acetilcolina hace que éstos se abran y permitan a los iones Ca^{2+}/Na^{+} la entrada en el sarcómero. La micrografía electrónica y los diagramas que la acompañan en la Figura 23.34 proporcionan una visión de la relación anatómica entre el nervio presináptico y el sarcómero.



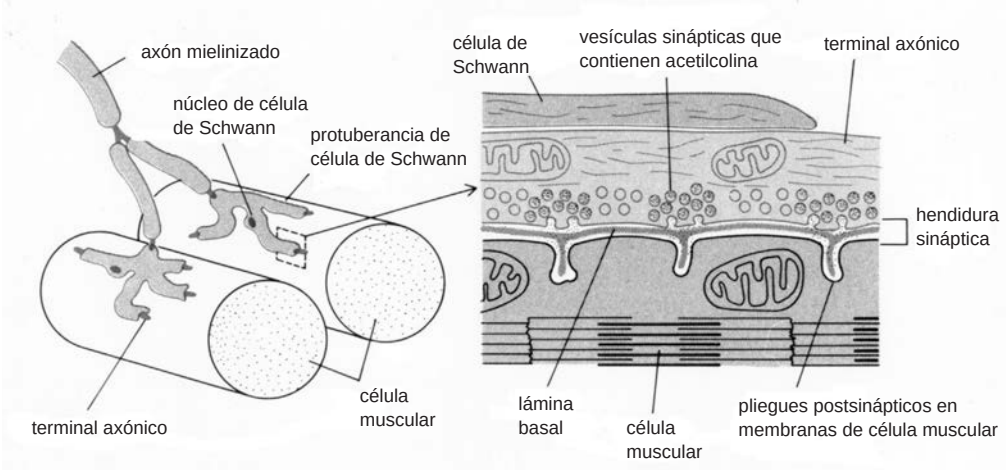
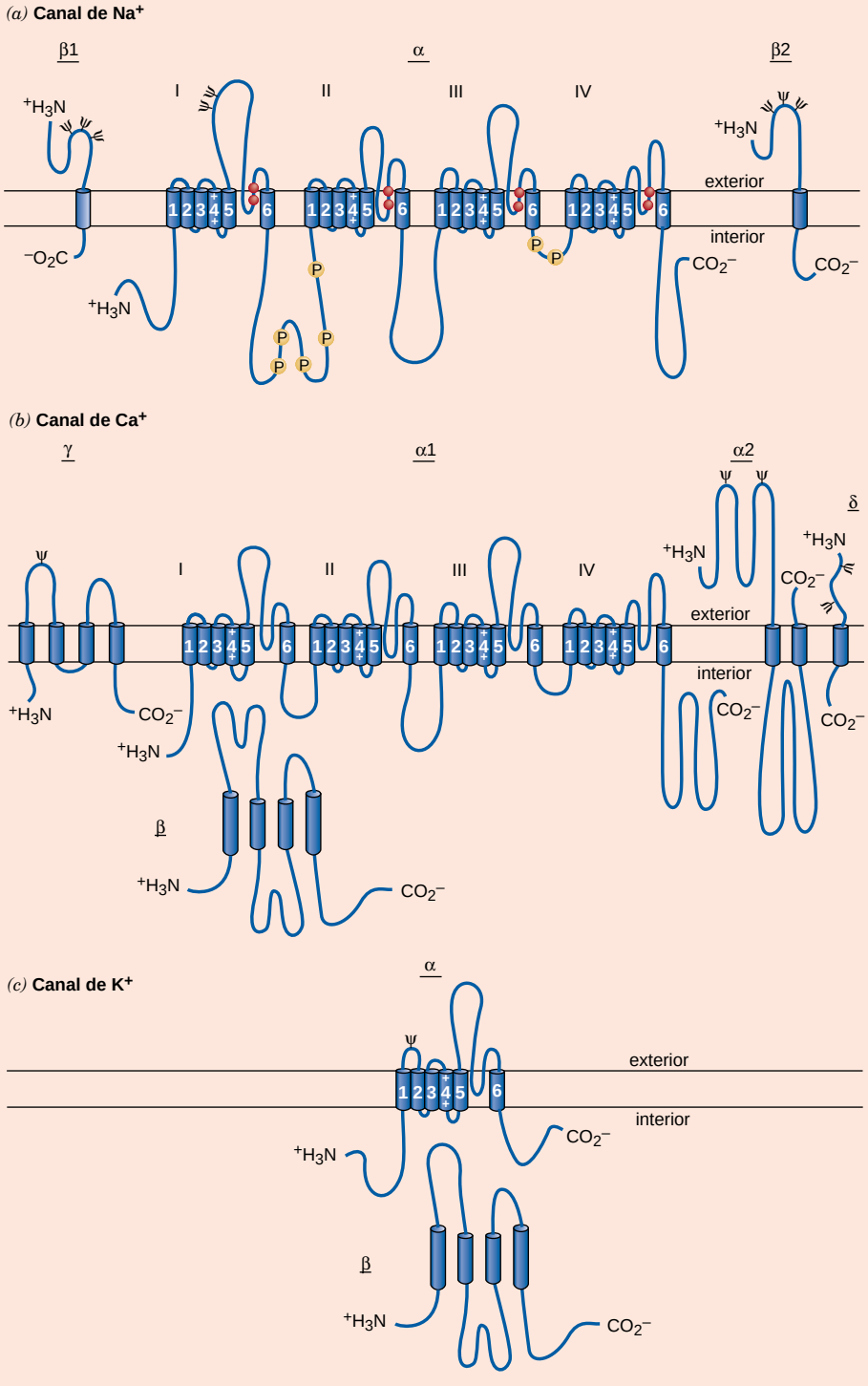


FIGURA 23.34
(*a*) Micrografía electrónica de una unión neuromuscular. (*b*) Representación esquemática de la unión neuromuscular mostrada en (*a*).
Reproducido con permiso de Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. Molecular Biology of the Cell. *New York: Garland Publishing, 1983.*

APLICACIÓN CLÍNICA 23.10

Enfermedades relacionadas con los canales iónicos con compuertas de voltaje

Los potenciales de acción del nervio y el músculo se propagan por medio de canales iónicos con compuertas de voltaje. Generalmente existen tres tipos reconocidos de canales catiónicos con compuertas de voltaje: de Na^+, de Ca^{2+} y de K^+. Todos ellos han sido clonados, su secuencia de aminoácidos ha sido deducida a partir de las secuencia de DNA, y se ha propuesto un modelo para explicar su estructura en la membrana, y se ha determinado la estructura 3-D de un canal de K^+. Los tres son proteínas heterogéneas que se componen de varias subunidades α y β. En la figura adjunta se muestra un modelo lineal para explicar la organización de estos canales. De hecho, se disponen de forma más o menos circular, con un canal en forma de embudo formado a través del centro de las subunidades α. Aún se están estudiando papeles para las subunidades β si bien parecen estabilizar o regular la actividad de las subunidades α.



Disposición transmembrana de las subunidades de los canales iónicos. Se indican los sitios de glucosilación y fosforilación.
De Catterall (1995).

Continúa en la p. 1027.

Apli. Clín. 23.10 (continuación)

Para estudiar la función de las subunidades se utilizan toxinas y mutagénesis. La tetrodotoxina y la saxitoxina bloquean los poros de los canales de Na^+ de la subunidad α. Las toxinas de escorpión también se unen a la subunidad α y parece que afectan a los procesos de activación e inactivación que originan la apertura o cierre de la compuerta. Este tipo de experimentos sugieren que la subunidad α interviene tanto en la conductancia como en la apertura o cierre de la compuerta.

Los canales con compuertas de voltaje de los tejidos nervioso y muscular presentan gran similitud en muchos de los dominios transmembrana, pero el grado de conservación es menor en los lazos conectores intracelulares. Se ha determinado la estructura 3-D de un canal de K^+ y a partir de ella se han construido modelos de otros canales con compuertas de voltaje. Algunos efectos de mutaciones en los canales se empiezan a entender mejor. Un efecto común de las mutaciones en los canales de Na^+ es debilidad muscular o parálisis. Más adelante se citan algunas enfermedades hereditarias relacionadas con los canales de iones Na^+ con compuertas de voltaje. En todas ellas la causa es un cambio en un único aminoácido de la subunidad α. La herencia suele ser dominante.

Se ha propuesto que si el potencial de membrana es ligeramente más positivo (p. ej., varía de −70 a −60 mV), la fibra muscular puede alcanzar el umbral con mayor facilidad y el músculo se hace hiperexcitable. Si el potencial de membrana toma un valor aún más positivo (p. ej., hasta −40 mV), la fibra no puede desencadenar un potencial de acción; esta incapacidad es sinónimo de parálisis. El defecto bioquímico fundamental es, en todos los casos, una mutación en la proteína que forma el canal.

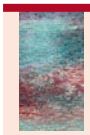
Enfermedad	*Característica clínica distintiva*
Parálisis periódica hipercaliémica	Inducida por el descanso después del ejercicio o por la ingestión de K^+
Paramiotonía congénita	Miotonía inducida por el frío
Miotonía de canales de sodio	Miotonía constante

Catterall, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64:493, 1995; Hoffmann, E. P. Voltage-gated ion channelopathies: inherited disorders caused by abnormal sodium, chloride, and calcium regulation in skeletal muscle. *Annu. Rev. Med.* 46:431, 1995; y Abraham, M. R., Jahangir, A., Alekseev, A. E. y Terzic, A. Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels. *FASEB J.* 13:1901, 1999.

A lo largo de la membrana, cerca de las líneas Z, se encuentran unos túbulos transversales conectados a las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático. Los impulsos nerviosos despolarizan la membrana plasmática y los túbulos transversales. Esta despolarización provoca una entrada de Ca^{2+} en el sarcómero. Como se ha indicado anteriormente, la concentración de Ca^{2+} aumenta unas 100 veces, permitiendo su unión a los sitios de baja afinidad de la Tn-C y el inicio del proceso de contracción (véanse Apli. Clín. 23.10 y Apli. Clín. 23.11 sobre los acontecimientos en el músculo cardíaco).

La hidrólisis del ATP aporta la energía para la contracción muscular

El ATP es un requisito absolutamente necesario para la contracción muscular. La hidrólisis del ATP por la **miosina–ATPasa** para dar el complejo miosina–ADP y fosfato inorgánico produce una conformación de la miosina que tiene una afinidad de unión para la actina más elevada. Para la disociación del complejo actina–miosina se requiere la disociación del ADP y la unión de ATP adicional.



APLICACIÓN CLÍNICA 23.11
Canales iónicos y enfermedades del músculo cardíaco

Los canales iónicos con compuertas de voltaje del músculo cardíaco, como los de los demás tejidos, necesitan un tiempo finito de recuperación tras la excitación. El corazón se contrae y se relaja de forma continua y rítmica que no puede alterarse significativamente sin causar problemas graves, tales como arritmias, fibrilación, y posiblemente la muerte. El tiempo de recuperación entre las contracciones del músculo cardíaco se mide en los electrocardiogramas según el intervalo QT. Al inicio de la fase de excitación tiene lugar la apertura de los canales de Na^+ durante un período finito de tiempo. El Na^+ entra en la célula provocando la despolarización. A continuación se abren los canales de K^+ para permitir al K^+ salir de la célula, ambos fluyendo a favor de sus respectivos gradientes de concentración química. La apertura de los canales de K^+ es clave para detener el potencial de acción. Existen patologías hereditarias conocidas genéricamente como síndrome del QT largo o LQTS. El LQTS hereditario se ha asociado a genes que afectan los canales de K^+ (*KVLQT1*, *HERG*, *mink*) y los canales de Na^+ (*SCN5A*). Defectos en estos canales en el músculo cardíaco pueden causar la muerte súbita, particularmente en personas jóvenes que son físicamente activas, que nunca se han hecho un electrocardiograma, y no saben que tienen LQTS. La prevalencia de esta patología es de aproximadamente 1 en 10 000.

Balser, J. R. Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovasc. Res.* 42:327, 1999; Ackerman, M. J., Schroeder, J. J., Berry, R., Schaid, D. J., Porter, C. J., Michels, V. V. y Thibodeau, S. N. A novel mutation in KVLQT1 is the molecular basis of inherited long QT syndrome in a near-drowning patient's family. *Pediatr. Res.* 44:148, 1998; y Barinaga, M. Tracking down mutations that can stop the heart. *Science* 281:32, 1998.

En el tejido muscular normal, la concentración de ATP en el sarcómero permanece bastante constante, incluso durante la actividad muscular enérgica. Esto se consigue mediante una actividad metabólica incrementada y mediante la acción de dos enzimas: la **creatina fosfoquinasa** y la **adenilato quinasa**. La creatina fosfoquinasa cataliza la transferencia de fosfato desde la fosfocreatina al ADP de modo energéticamente favorable:

$$\text{Fosfocreatina} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{creatina}$$

Si el proceso metabólico es insuficiente para mantener la demanda energética, el sistema de la creatina fosfoquinasa sirve como "tampón" para el mantenimiento del nivel de ATP celular. El segundo enzima es la adenilato quinasa, que cataliza la reacción

$$2\ \text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$$

El agotamiento del ATP tiene consecuencias graves para las células del músculo. Cuando se agota el suministro de ATP y ya no se controla la concentración intracelular de Ca^{2+}, la miosina se encontrará exclusivamente unida a la actina, un estado denominado **rigor mortis**. Una función principal del ATP en la contracción muscular es favorecer la disociación del complejo actina–miosina y no su formación.

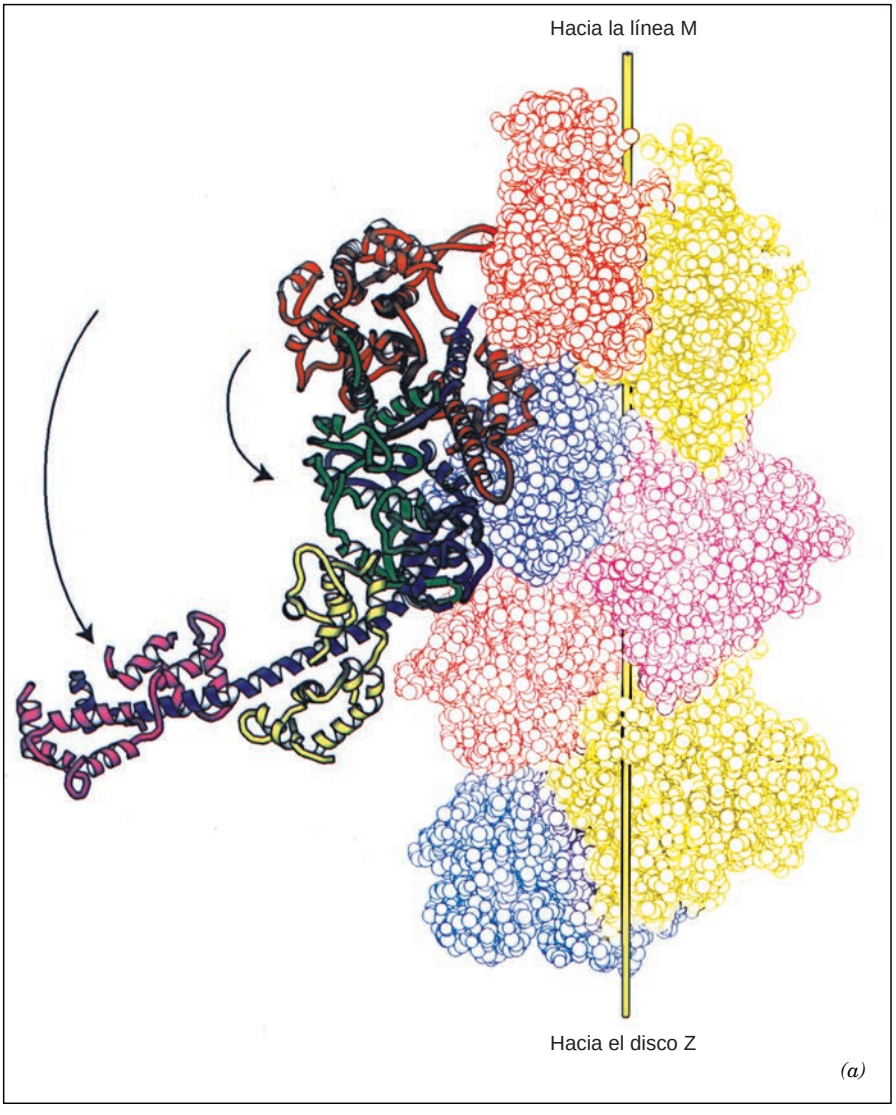


FIGURA 23.35
Modelo de la interacción actina–miosina. (*a*) La miosina se muestra como una cinta y la actina según representación espacial. Cada monómero de actina G se representa mediante colores distintos. (*b*) Visión estereoscópica de la miosina mostrando la cavidad que contiene los residuos de cisteína "reactiva" móviles. (*c*) Esquema que muestra como los cambios conformacionales en el grupo de cabeza y el brazo de la miosina pueden tirar de los filamentos de actina en dirección contraria al disco Z durante la hidrólisis del ATP y la liberación de fosfato inorgánico.
Parte (a) y (b) tomado con permiso de Rayment, I. y Holden, H. M. The three dimensional structure of a molecular motor. Trends Biol. Sci. 19:129, 1994, with permission from Elsevier Science.

Continúa en la p. 1029.

Modelo de contracción del músculo esquelético

En la Figura 23.35 se muestra un modelo para el complejo actina–miosina. Las cabezas de la miosina sufren cambios conformacionales tras la unión del ATP, la hidrólisis del ATP y la liberación de los productos. La unión del ATP conduce al cierre de la hendidura del sitio activo y a la apertura de la hendidura situada en la región del sitio de unión de la actina. La hidrólisis del ATP da lugar al cierre de la hendidura en la región de unión a la actina, que se abre de nuevo al liberarse el fosfato inorgánico. El cambio conformacional que tiene lugar se pone de manifiesto por los movimientos de dos hélices que contienen cisteína. La distancia entre Cys^{697} y Cys^{707} pasa de 19 Å a unos 2 Å. Si se evitan cambios conformacionales posteriores por entrecruzamiento de estas dos cisteínas, el ADP queda atrapado en su sitio de unión. En la Figura 23.35*b* se presenta una visión estereoscópica de la miosina, mostrando la cavidad de cisteínas reactivas. Los cambios conformacionales en la miosina que tienen lugar en conjunción con el cierre y apertura de la hendidura de la región de unión a la actina durante la hidrólisis del ATP están asociados con el denominado **golpe de potencia**.

Muchas de las principales proteínas implicadas en la contracción muscular se han cristalizado y se conocen sus estructuras 3-D. Se están dedicando grandes esfuerzos a determinar exactamente como trabajan juntas para provocar la contracción. Los detalles de la cinética y la información estructural adicional refinarán el conocimiento de este proceso. Una secuencia de acontecimientos lógica basada en el conocimiento actual puede resumirse de la siguiente forma. En el estado de reposo existe un complejo miosina-ATP. Asimismo, en el estado de reposo, el complejo de troponina del filamento delgado está en una conformación con la actina que evita la interacción miosina-actina. Tras la despolarización, entra Ca^{2+} en el sarcómero, se une a la Tn-C del complejo de troponina, y provoca un cambio conformacional en Tn-I que se propaga a través de la tropomiosina a la actina, dando como resultado la exposición de los sitios de unión de miosina en la actina. La interacción

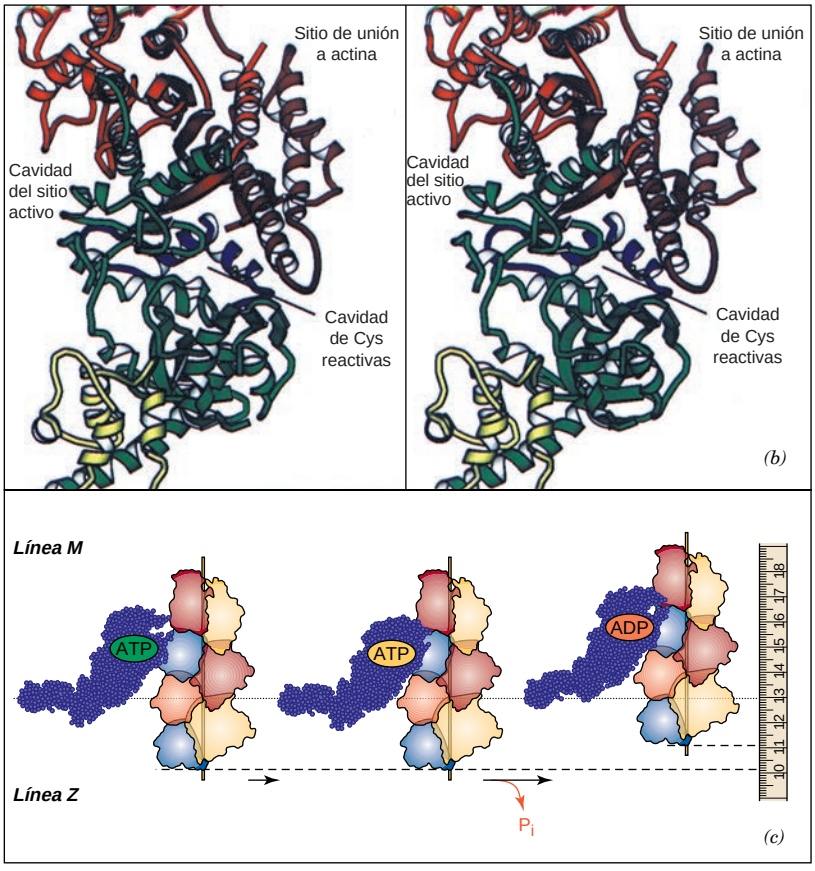


Figura 23.35 continuación

inicial entre la miosina y la actina es débil, pero se propaga a través de la tropomiosina a la actina dando como resultado la exposición de los sitios de unión a la miosina en la actina. La interacción inicial entre la miosina y la actina es débil, pero estimula la actividad ATPasa de la miosina. El ATP se hidroliza a ADP y P_i, lo que conduce a una conformación de la miosina que tiene una afinidad más fuerte por la actina, aproximadamente 10 000 veces más fuerte. La miosina sufre entonces un gran cambio conformacional desde un estado cerrado a uno abierto con la liberación de fosfato inorgánico. Este cambio conformacional conduce o está acompañado del movimiento del grupo de cabeza y la región del brazo de la miosina, tal como se muestra en la Figura 23.35*a*, con un acortamiento concomitante del sarcómero, el golpe de potencia, que acorta la distancia entre las líneas Z. Durante este proceso el filamento de actina puede moverse hasta 10 nm. La conformación abierta de la miosina está ahora en disposición de unir ATP y empezar de nuevo el ciclo. En la Figura 23.35*c* se muestra un esquema de como puede tener lugar este proceso.

El filamento grueso está anclado en el centro del sarcómero y los grupos de cabeza de la miosina se polarizan en direcciones opuestas a cada lado de la línea M. Cada filamento grueso contiene centenares de S-1 o unidades de cabeza de la miosina rodeados por seis filamentos finos de actina. Las unidades individuales de miosina funcionando de modo asincrónico —posiblemente del mismo modo que lo hacen las manos sobre la cuerda en el juego de estirar la cuerda— pueden de este modo mantener la fuerza o crear la máxima fuerza. Así, cuando unos grupos de cabeza de la miosina se unen con gran afinidad, otros tienen una afinidad baja, y esta acción de unión, tirón (cambio conformacional), liberación, y unión de la miosina acorta el sarcómero de forma apropiada para conseguir una fuerza.

El calcio regula la contracción del músculo liso

Los iones calcio también juegan un papel importante en la contracción del músculo liso, pero existen algunas diferencias importantes en el mecanismo por el que actúa. En la Figura 23.36 se muestra un mecanismo para la regulación del calcio en la contracción del músculo liso. Los elementos clave de este mecanismo son los siguientes: (1) Una forma fosforilada de la cadena ligera de miosina estimula la Mg-ATPasa,

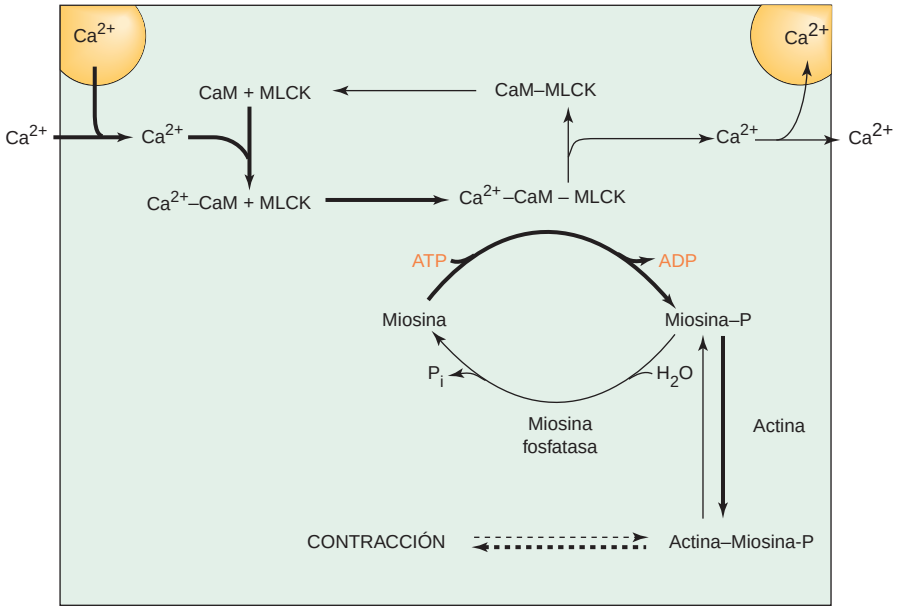


FIGURA 23.36
Representación esquemática del mecanismo de regulación de la contracción del músculo liso.
Las flechas de trazo grueso muestran la ruta del desarrollo de la tensión y las flechas de trazo fino muestran la ruta de la liberación de la tensión. La actividad Mg^{2+}-ATPasa es máxima en el complejo actina–miosina-P. CaM, calmodulina; MLCK, quinasa de la cadena ligera de la miosina.
Adaptado de Kramm, K. E. y Stull, J. T. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *25:593, 1985.*

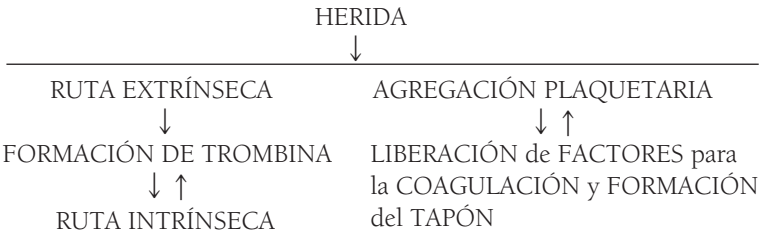
que suministra la energía para el proceso contráctil. (2) Mediante una **quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK)** se fosforila la cadena ligera de la miosina. (3) Mediante un complejo Ca^{2+}–calmodulina (CaM) se activa la MLCK. (4) La formación del complejo Ca^{2+}–CaM depende de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Para el control del proceso es importante la liberación de Ca^{2+} a partir de sus reservas intracelulares o el incremento de su flujo a través de la membrana plasmática. (5) La contracción se detiene por acción de una **miosina fosfatasa** o por el transporte de Ca^{2+} hacia el exterior de las células. Parece ser que en la regulación de la contracción en el músculo liso se requieren muchas más etapas bioquímicas, etapas que pueden ser reguladas por hormonas u otros agentes. Sirven adecuadamente para la función de los músculos lisos, dándoles la capacidad de desarrollar varios grados de tensión y retenerla durante períodos de tiempo prolongados.

23.5 MECANISMO DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

La circulación sanguínea es esencial para la vida y, por tanto, ha de mantenerse la integridad del proceso. Se conoce bien la importancia de la circulación sanguínea en el transporte de oxígeno y nutrientes a las células, en el transporte de dióxido de carbono y productos de desecho desde las células y en el mantenimiento del pH. La circulación sanguínea tiene lugar en un tipo de sistema cerrado altamente especializado en el cual el volumen de fluido circulante se mantiene prácticamente constante. Éste es también un sistema en que la transferencia de solutos a través de sus límites es necesaria para su función. Como en cualquier sistema de tubos y cañerías, pueden tener lugar fugas como resultado de varios tipos de lesiones, que deben ser reparadas para mantener un estado de homeostasis, es decir sin hemorragias. Esta sección se centra en algunos de los procesos bioquímicos que intervienen en la hemostasis, en particular en la coagulación de la sangre.

Procesos bioquímicos de la hemostasis

La hemostasis implica que el proceso de formación de coágulos (**procoagulación**) esté en equilibrio con los procesos que detienen la formación de coágulos (**anticoagulación**) y de su disolución (**fibrinólisis**). El proceso de procoagulación conduce a la producción de fibrina a partir del fibrinógeno y la agregación de la fibrina en una malla insoluble, o coágulo, que cubre el área de la lesión y evita que continúe la pérdida de sangre. Durante el mismo período de tiempo, tiene lugar la agregación de plaquetas en el lugar de la herida. La agregación de plaquetas forma un tapón físico para ayudar a detener la fuga. Los cambios morfológicos que sufren las plaquetas provocan la liberación de sustancias químicas que contienen y que ayudan en otros aspectos al proceso global. Algunas de las sustancias químicas liberadas estimulan la agregación de plaquetas, de un modo autofacilitado. Algunas causan vasoconstricción para reducir el caudal de sangre hacia el área, y algunas son enzimas que ayudan directamte en la formación del coágulo. Los pasos que intervienen en la fase inicial de este proceso se muestran esquemáticamente en el diagrama siguiente.



Las flechas duales no pretenden implicar que estos pasos son directamente reversibles, sino que indican que los procesos que unen son mutuamente facilitados.

La siguiente fase de la hemostasis, la fase de anticoagulación, se inicia pronto en el proceso, tan pronto como es cinéticamente posible, y evita la formación excesiva de coágulo. Finalmente, el proceso de disolución del coágulo o fibrinólisis tiene lugar cuando el propio vaso herido está suficientemente reparado para evitar la hemorragia. Muchas de las proteínas que intervienen en el proceso de coagulación de la sangre contienen dominios de tipo **factor de crecimiento epidérmico**

(EGF) que pueden actuar directa o indirectamente para facilitar la regeneración de las áreas dañadas de los vasos sanguíneos. Todos estos procesos son dinámicos y la mayoría de ellos son impulsados por procesos cinéticos y de acción de masas. De esta forma una fase no finaliza antes de que se inicie la otra fase. La coagulación de la sangre no es un proceso de transducción de señal en el mismo sentido que otros aspectos tratados en este capítulo. Se trata en cambio de un proceso dinámico de amplificación y modulación de señal.

Algunas de las principales proteínas que intervienen en este proceso se mencionan en la Tabla 23.9, no necesariamente en orden de aparición. Todas son importantes y seguramente se irán añadiendo otras nuevas. Es importante remarcar que las anomalías estructurales, principalmente mutaciones, en regiones críticas de cualquiera de estas proteínas, pueden afectar adversamente la coagulación y los procesos de disolución del coágulo y conducir a estados patológicos.

La formación del coágulo se ha descrito como un proceso en el que intervienen dos rutas distintas: la **intrínseca** o **ruta del factor de contacto** y la **extrínseca** o **ruta del factor tisular.** Ambas rutas conducen a la activación del factor X. A partir de este punto, existe una única ruta para la formación del coágulo. Históricamente, el término ruta intrínseca se utilizó al observar que la coagulación de la sangre podía tener lugar espontáneamente cuando la sangre se introducía en tubos de ensayo de cristal limpio, sugiriendo la idea de que todos los componentes necesarios para la formación del coágulo eran intrínsecos a la sangre circulante. El vidrio contiene **superficies aniónicas** que forman puntos de nucleación que inician el proceso. En los mamíferos existen superficies aniónicas que quedan expuestas tras la rotura del **revestimiento endotelial** de los vasos sanguíneos, y constituyen sitios de unión y activación de factores específicos que inician la coagulación en la ruta intrínseca. De forma similar, el término extrínseco se utilizó tras la observación de que existía un

TABLA 23.9 Algunos factores que intervienen en la coagulación de la sangre, en su control y en la disolución del coágulo

Factor	*Nombre*	*Ruta*	*Característica*	*Concentración*[a]
I	Fibrinógeno	Ambas		9,1
II	Protrombina	Ambas	Contiene residuos Gla en el N-terminal	1,4
III	Factor tisular	Extrínseca	Proteína transmembrana	—
IV	Iones calcio	Ambas		—
V	Proacelerina	Ambas	Cofactor proteico	0,03[b]
VII	Proconvertina	Extrínseca	Endopeptidasa con residuos Gla	0,01[c]
VIII	Antihemofílico	Intrínseca	Cofactor proteico	0,0003[b]
IX	Factor de Christmas	Intrínseca	Endopeptidasa con residuos Gla	0,089
X	Factor de Stuart	Ambas	Endopeptidasa con residuos Gla	0,136
XI	Antecesor de tromboplastina	Intrínseca	Endopeptidasa	0,031
XII	Factor de Hageman	Intrínseca	Endopeptidasa	0,375
XIII	Proglutamidasa	Ambas	Transpeptidasa	0,031[b]
	Antiplasmina α_2		Inhibidor de plasmina	0,953
	Antitrombina III	Ambas	Inhibidor de trombina	3,0
	Heparina Co-II	Ambas	Inhibidor de trombina	1,364
	HMWK[d]	Intrínseca	Proteína receptora	0,636
	Macroglobulina α_2		Inhibidor de proteasa	2,9
	Plasminógeno		Zimógeno/disolvente del coágulo	2,4
	Precalicreína	Intrínseca	Zimógeno/ activador de factor XII	0,581
	Proteína C	(Ambas)	Endopeptidasa con residuos Gla	0,065
	Inhibidor de proteína C		Inhibidor de proteína C	0,070
	Proteína S	(Ambas)	Cofactor con residuos Gla	0,030
	Proteína Z	Ambas	Cofactor con residuos Gla para el inhibidor de proteína Z	0,08
	Inhibidor de proteína Z	Ambas	Inhibidor del factor Xa	0,018
	TFPI[e]		Inhibidor de la ruta del factor tisular	0,003

[a]Las concentraciones son aproximadas y están indicadas en micromolaridad.

[b]Estos valores se aproximan a las concentraciones en solución, ya que se encuentran en parte unidos a otras proteínas en las plaquetas.

[c]Este factor circula probablemente como FVII y FVIIa.

[d]El HMWK es el quininógeno de elevada masa molecular.

[e]El TFPI es el inhibidor de la ruta del factor tisular, antes conocido como factor de coagulación asociado a lipoproteínas (LACI).

factor extrínseco a la sangre circulante que facilitaba la coagulación. Este factor se identificó como el **factor III**, o factor tisular (véase la Figura 23.38*a*), una proteína integral de membrana que también resulta expuesta tras la rotura de los vasos sanguíneos. Ya sea intrínseco o extrínseco, el proceso de coagulación de la sangre se origina en la membrana y continúa por la superficie de la membrana en el lugar de la herida. Cada vez es más evidente que hay un elevado grado de interdependencia en las dos rutas tradicionalmente designadas para efectuar el proceso de coagulación.

A lo largo de esta sección nos referiremos a los factores de coagulación en su forma no activada con la letra "F" seguida de la denominación tradicional en números romanos para cada factor, por ejemplo, **FVII** para el factor VII. La letra "a" indicará las formas activadas, por ejemplo FVIIa para la forma activada del factor VII. Otras abreviaturas se definirán cuando sea necesario.

Fase de procoagulación de la hemostasis (Fase 1)

Los análisis cinéticos de la aparición y las concentraciones de las diversas proteínas y zimógenos que intervienen en la cascada de la coagulación sanguínea demuestran que la ruta extrínseca inicia la formación de un coágulo sanguíneo. Éste es un proceso en una etapa que activa el enzima clave, FX a FXa, que es el responsable de la activación de la protrombina. La trombina, que se forma a partir de la protrombina en el proceso de activación, es un enzima clave para la formación del coágulo y para el inicio de muchas otras reacciones que intervienen en el proceso global de hemostasis. En la Figura 23.37 se muestra un esquema de las reacciones que intervienen en la fase de procoagulación, incluyendo la ruta extrínseca y la intrínseca.

Ruta extrínseca e inicio de la coagulación

El receptor de membrana que inicia la fase de procoagulación es el FIII o **factor tisular (TF)**, una proteína transmembrana de 263 aminoácidos. Los residuos 1–219 se

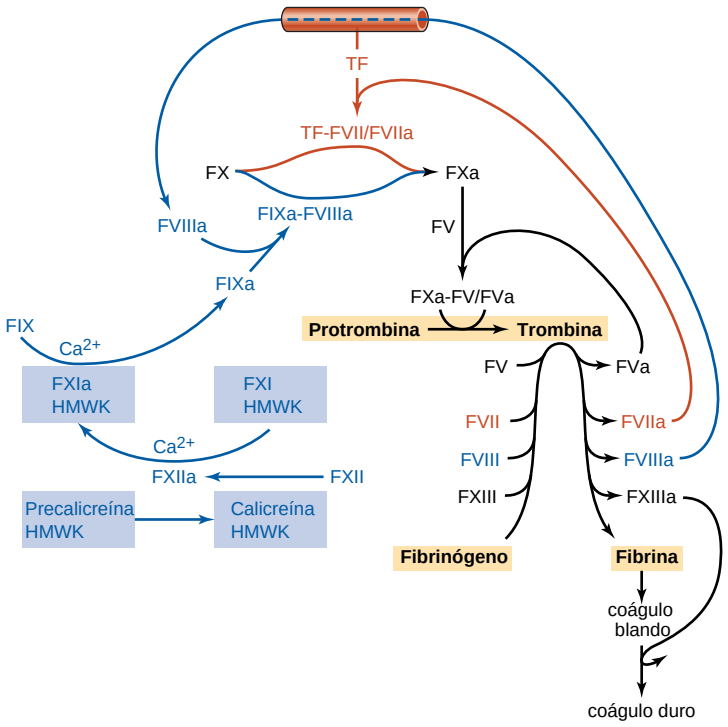


FIGURA 23.37
Diagrama de la fase I del esquema de coagulación de la sangre.
Las reacciones de la ruta extrínseca se muestran en rojo, las de la ruta intrínseca en azul, y las comunes a ambas rutas, en negro. Los productos finales principales del esquema están resaltados en amarillo. HMWK, quininógeno de elevada masa molecular. Los factores activados se designan con la letra "a".

encuentran en el la cara extracelular de la membrana, quedan expuestos después de la herida, y constituyen el receptor al que se une FVII. FVII es una proteína que contiene **γ-carboxiglutámico** (Gla) y que se une al factor tisular sólo en presencia de Ca^{2+}. El complejo resultante (FVII–Ca^{2+}–TF) es el complejo enzimático inicial de la ruta extrínseca, y su acción inicia el proceso de coagulación de la sangre. TF y FVII son exclusivos de la ruta extrínseca y son esencialmente sus únicos componentes principales. La forma zimógena de FVII se activa inicialmente a través de la interacción proteína–proteína resultante de su unión a TF. Mediante rotura proteolítica por la trombina se activa más FVII. Normalmente existe una pequeña cantidad de FVIIa. A diferencia de otras proteinasas del sistema de la coagulación sanguínea, la vida media del FVIIa en la sangre es larga. Una vez disociado del TF, el FVIIa no es catalíticamente activo, y su presencia en la sangre es inofensiva. La formación del complejo inicial con el TF puede implicar parte del FVIIa ya formado. Por tanto no es posible afirmar con total seguridad si es la forma zimógena del FVII formando complejo con el TF, o es la forma activada FVIIa, la responsable de la activación inicial del FX.

Formación de trombina

FXa y FV forman un complejo denominado protrombinasa, que cataliza la formación de trombina a partir de la protrombina a través de una reacción de rotura proteolítica. La relativamente pequeña cantidad de trombina formada en esta fase de inicio (véase Figura 23.37) cataliza la activación de FV, FVII, FVIII, y FXIII además de la formación de fibrina a partir de fibrinógeno.

Las reacciones descritas hasta ahora son las que intervienen para iniciar el proceso pero son insuficientes para formar fibrina de forma suficientemente rápida como para formar un coágulo efectivo. La formación de trombina es la clave para mantener y acelerar la ruta extrínseca así como para activar uno de los principales cofactores proteicos, FVIII, que es necesario para la ruta intrínseca. Los componentes del sistema están ahora activados y dispuestos para la rápida formación del coágulo.

Reacciones de la ruta intrínseca

En la Figura 23.37 se muestran también las reacciones de la ruta intrínseca. La rotura del revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos causa también la exposición de superficies membranosas aniónicas. El zimógeno de proteinasa **FXII** se une directamente a algunas de estas superficies aniónicas y sufre un cambio conformacional que aumenta su capacidad catalítica de 10^4 a 10^5 veces. La **precalicreína** y el **FXI**, también zimógenos, circulan en la sangre formando complejos independientes con el **quininógeno de elevada masa molecular (HMWK)**: los complejos FXI–HMWK y precalicreína–HMWK. El FXI y la precalicreína se unen a los sitios aniónicos de las superficies de membrana expuestas a través de sus interacciones con el HMWK. Esta interacción lleva estos zimógenos al lugar de la herida y en proximidad directa con FXII. La forma "activada" unida a membrana de FXII activa la precalicreína para producir **calicreína**. La calicreína activa más FXII para dar FXIIa. FXI está unido a la membrana a través de su unión no covalente con HMWK y es activado por el FXIIa a través de una rotura proteolítica para dar FXIa. FXIa activa **FIX** a FIXa (véase Apli. Clín. 23.12). FIXa en presencia de **FVIIIa** también activa **FX** a FXa. Ésta es en esencia una cascada de cuatro niveles iniciada por la activación por "contacto" de FXII y la acción autocatalítica entre el FXII y la calicreína para dar FXIIa (nivel 1). El FXIIa activa el FXI (nivel 2); FXIa activa el FIX (nivel 3); y el FIXa, en presencia de FVIIIa, activa el FX (nivel 4). Si cada molécula de enzima activada también cataliza la formación de otros 100 antes de su inactivación, el factor de amplificación será de 1×10^6, a partir de solamente esta parte de la ruta. Sin embargo, como se muestra en el diagrama, varios bucles de retroalimentación aceleran el proceso global para producir un coágulo de fibrina de forma rápida y eficiente. Durante este tiempo, el FXIII, una transglutaminasa que ha sido activada también por la trombina, se encuentra formando activamente un coágulo duro catalizando la formación de entrecruzamientos entre monómeros de fibrina del coágulo blando. Este es el proceso general de formación del coágulo. Será instructivo ahora tratar de algunas propiedades de las proteínas que intervienen en el esquema.

Factor tisular (TF), (FIII): El TF (véase Figura 23.38*a*) es una proteína transmembrana de 263 aminoácidos. Los residuos 243–263 se sitúan en la cara citosólica de la membrana. Los residuos 1–219 se encuentran en el exterior de la membrana, quedan expuestos después de la herida, y constituyen el receptor para la

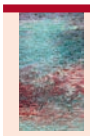
formación del complejo inicial de la ruta extrínseca. Este dominio está glucosilado y contiene cuatro residuos de cisteína. En la Figura 23.38*b* se muestra una representación estereoscópica de un fragmento de este dominio, en la que se resaltan algunos de los residuos aminoácidos que intervienen en la unión al **FVII**.

Factor VII: En la Figura 23.39 se muestra una representación estructural 3-D de cintas del FVIIa. En el modelo se resaltan las regiones que intervienen en la interacción con el TF, la unión al Ca^{2+}, y la cavidad donde se une el sustrato.

Factor X: En la Figura 23.40 se muestra una vista estereoscópica del factor Xa. Éste se forma tanto en la ruta extrínseca como en la intrínseca por rotura enzimática del FX en las posiciones 145 y 151 con eliminación de un péptido de seis aminoácidos

Trombina: La trombina circula en el plasma como protrombina. La protrombina es una proteína de 72 kDa (Figura 23.41), que contiene diez **residuos de γ-carboxiglutamato (Gla)** en su región N-terminal. La unión de Ca^{2+} a estos residuos facilita la unión de la protrombina sobre la superficie de la membrana y al complejo FXa–FVa en el lugar de la herida. El complejo protrombinasa (FXa–FVa) activa la protrombina mediante dos cortes proteolíticos en el lado carboxilo de residuos de arginina, primero en la posición 320 y a continuación en la posición 284. La molécula de trombina activa (α-trombina) está constituida por dos cadenas, una de 6 kDa y otra de 31 kDa, unidas covalentemente por un puente disulfuro. La Figura 23.42 muestra una visión estereoscópica de la molécula de α-trombina activa. En ella se destacan las regiones implicadas en alguna de sus funciones. El fibrinógeno es el sustrato de la trombina.

Fibrinógeno/Fibrina: El fibrinógeno es una molécula grande de aproximadamente 340 kDa, que está constituida por dos unidades tripeptídicas con estructura α,β,γ (véase Figura 23.43). Las subunidades están unidas entre sí en sus regiones N-terminales mediante puentes disulfuro. El fibrinógeno presenta tres dominios globulares, uno en cada extremo y otro en el medio, donde se juntan las cadenas. Los dominios globulares están separados entre sí por dominios en forma de varilla. Un corto segmento de las regiones N-terminal libres se proyecta hacia fuera desde el dominio globular central. A través de repulsión carga–carga, las regiones N-terminales de $\alpha\alpha'$ y de $\beta\beta'$ evitan la agregación del fibrinógeno. La trombina corta estos péptidos N-terminales permitiendo que se agreguen las moléculas de fibrina resultantes y se forme el **coágulo "blando"**. Este coágulo blando se estabiliza y se fortalece por la acción del **FXIIIa**, una transglutaminasa. Este enzima cataliza la formación de un enlace isopeptídico por sustitución del grupo δ-amida de residuos



APLICACIÓN CLÍNICA 23.12
Defectos en la ruta intrínseca: déficit de precalicreína

Los componentes de la ruta intrínseca incluyen los factores XII (factor de Hageman), XI, la precalicreína (factor de Fletcher), y el quininógeno de elevada masa molecular. Se han asociado alteraciones clínicas con defectos de cada uno de estos componentes. Las alteraciones hereditarias de cada uno de ellos parecen ser autosómicas recesivas. Todas parecen estar asociadas con un aumento en el tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT). El único de estos componentes que está directamente relacionado con una alteración clínica hemorrágica es el déficit de factor XI.

En algunos casos en los que existe un déficit de precalicreína (factor de Fletcher) se da una autocorrección tras prolongar la fase de preincubación de la prueba del APTT. Este fenómeno se explica por la capacidad del factor XII de ser activado mediante un mecanismo autocatalítico. La reacción es muy lenta cuando hay déficit de precalicreína, ya que no puede tener lugar la autoactivación recíproca rápida ente el factor XII y la precalicreína. El déficit de precalicreína puede responder a una disminución en la cantidad de proteína sintetizada, a una alteración genética en la propia proteína que interfiera con su capacidad de ser activada o con su capacidad de activar el factor XII. El desconocimiento de la estructura del gen de la precalicreína impide explicar de manera definitiva los mecanismos que operan en los pacientes con déficit de precalicreína. Sin embargo, las carencias específicas de la ruta intrínseca pueden localizarse en un factor determinado si se realiza el número adecuado de pruebas. En éstas se puede incluir una medida directa de la cantidad de cada uno de los factores presentes a nivel plasmático en el paciente, además de la prueba de APTT, realizada con y sin un tiempo de preincubación prolongado. La utilización de estas medidas directas permitió diagnosticar una carencia de precalicreína en una paciente de 9 años de edad, con un APTT prolongado. El nivel funcional de precalicreína en esta paciente era inferior a 1/50 del valor mínimo normal. Una prueba inmunológica (ELISA, véase p. 456) mostró un nivel de antígeno del 20–25%, lo que sugería que estaba sintetizando una molécula no funcional.

Coleman, R. W., Rao, A. K. y Rubin, R. N. Fletcher factor deficiency in a 9-year-old girl: mechanisms of the contact pathway of blood coagulation. *Am. J. Hematol.* 48:273, 1995.

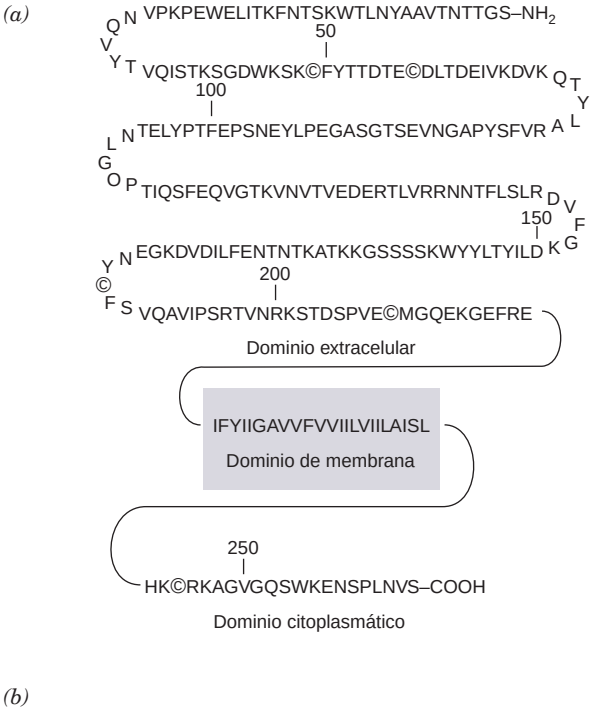


FIGURA 23.38
Factor tisular.
(*a*) Secuencia de aminoácidos del factor tisular humano, deducida a partir de su secuencia de cDNA. (*b*) Visión estereoscópica de la cadena de carbonos α del dominio extracelular del factor tisular. En amarillo se indican los residuos importantes para la unión del factor VII. En azul claro se muestran los grupos de residuos aromáticos y cargados.
Parte (a) adaptado de Spicer, E. K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *84:5148, 1987; parte (b) reproducido con permiso de Muller, Y. A., Ultsch, M. H., Kelley, R. F. y deVos, A. M.* Biochemistry *33:10864, 1994. Copyright, 1994, American Chemical Society.*

glutamina de una cadena con el grupo ϵ-amino de residuos de lisina de otra cadena (Figura 23.44), liberándose amoníaco. Este entrecruzamiento de la fibrina completa las etapas que intervienen en la formación del coágulo duro.

Factor V: La α-trombina activa los cofactores proteicos FV y FVIII e interviene en la agregación plaquetaria. El FV es una proteína de 330-kDa. La activación del FV por la trombina tiene lugar mediante una rotura proteolítica en la Arg^{709} y la Arg^{1545}. El FVa es un heterodímero formado por un dominio N-terminal (105 kDa) y un dominio C-terminal (74 kDa) unidos de forma no covalente por Ca^{2+} (véase Figura 23.45).

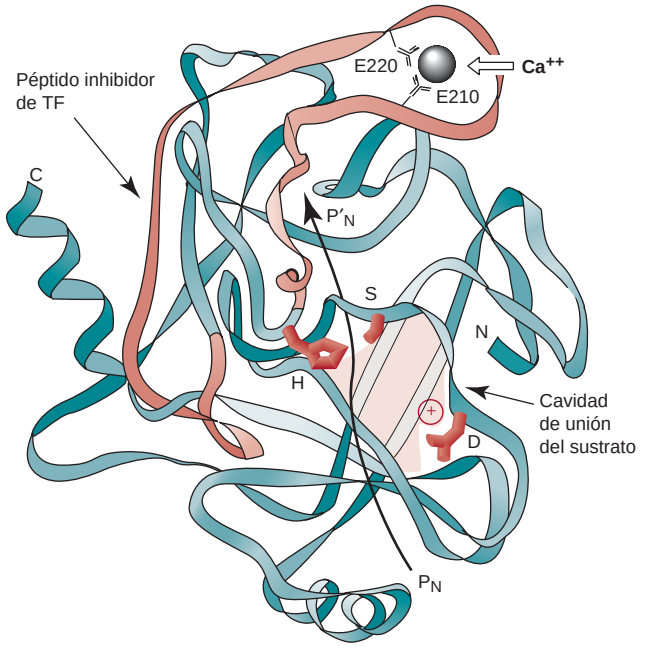


FIGURA 23.39
Representación estructural en cinta del dominio proteasa del factor VIIa. La cinta oscura, marcada como "péptido inhibidor de TF" representa una zona implicada en la unión al factor tisular. La tríada catalítica se muestra en la cavidad de unión al sustrato como H, S y D, correspondiente a His^{193}, Ser^{344} y Asp^{338}, respectivamente. La flecha marcada P_N–P'_N señala la posible región extendida de unión al sustrato.
Reproducido con permiso de Sabharwal, A. K., Birktoft, J. J., Gorka, J., et al. J. Biol. Chem. *270:15523, 1995.*

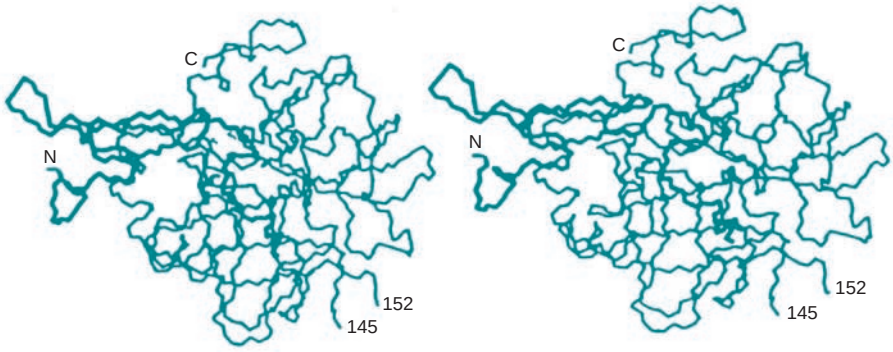


FIGURA 23.40
Visión estereoscópica de la estructura del esqueleto CN del factor Xa.
El dominio de tipo EGF está señalado con trazo grueso.
Adaptado de Padmanabhan, K., Padmanabhan, K. P., Tulinsky, A., et al. J. Mol. Biol. *232:947, 1993.*

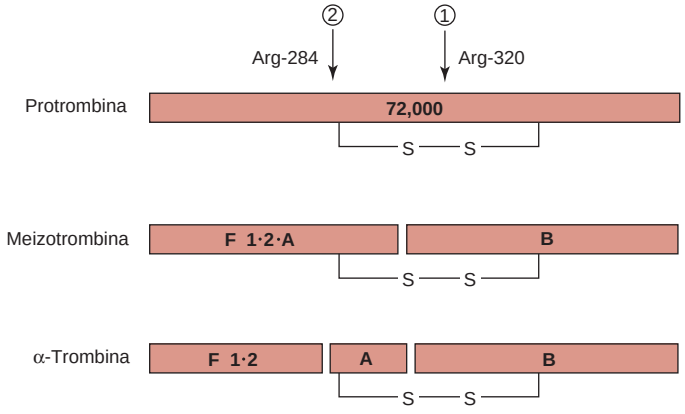


FIGURA 23.41
Esquema de la activación de la protrombina.

Factor VIII: el **FVIII** circula en el plasma unido a otra proteína, el **factor de von Willebrand (vWf)**. El FVIII es una proteína de 285 kDa que se activa mediante el corte por trombina en las posiciones Arg^{372}, Arg^{740}, Arg^{1648} y Arg^{1689}. El último corte libera FVIIIa del vWF. El FVIIIa es un heterotrímero (véase la Figura 23.45) formado por los péptidos N-terminal de 40 kDa (A_2) y 50 kDa (A_1), y un péptido C-terminal de 74 kDa (A_3). El FVIIIa contiene además un puente de Ca^{2+} entre los dominios N- y C-terminal. La carencia de factor VIII da lugar a la hemofilia clásica

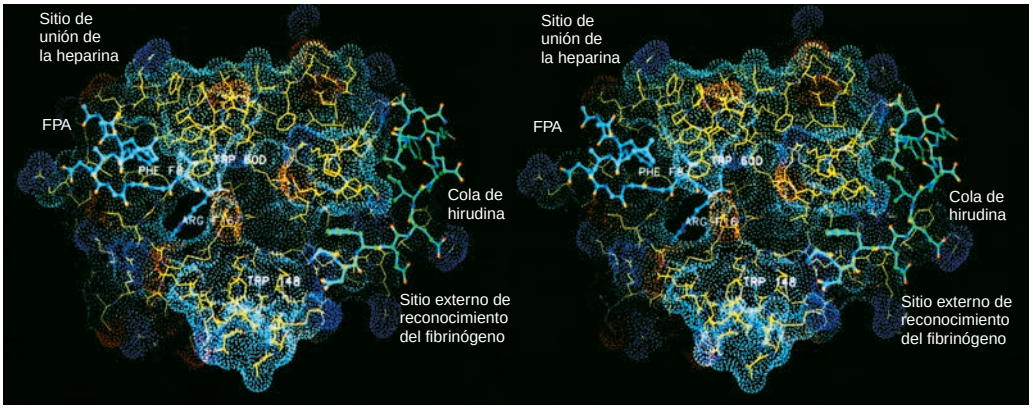


FIGURA 23.42
Visión estereoscópica de la hendidura del sitio activo de la trombina α humana.
En azul oscuro, los aminoácidos básicos; en rojo, los ácidos; en azul claro, los neutros. El sitio activo se extiende de izquierda a derecha. *Tomado de Stubbs, M. T. y Bode. W. The clot thickens: clues provided by thrombin structure. Trends Biol. Sci. 20; 23, 1995, con permiso de Elsevier Science.*

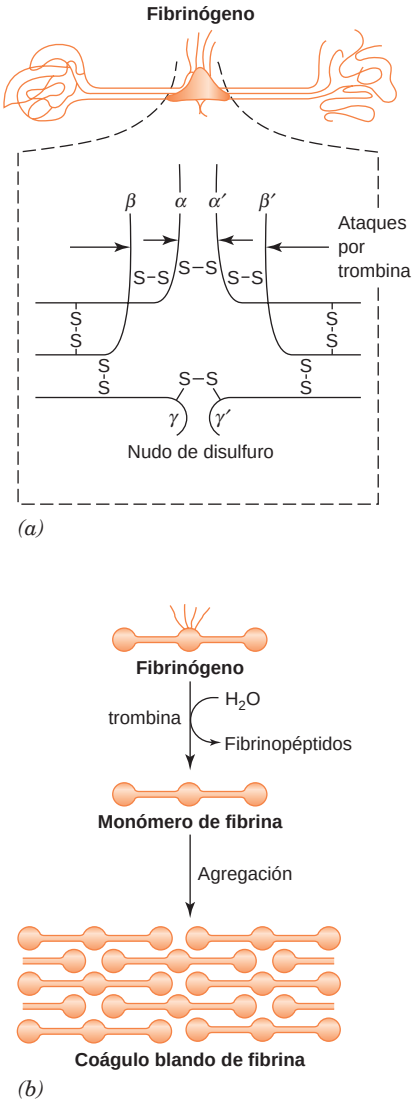


FIGURA 23.43
Esquema de la molécula de fibrinógeno y su conversión en coágulo blando de fibrina.

(Apli. Clín. 23.13). Debería estar claro a partir de la descripción de la fase de procoagulación que las reacciones de la ruta intrínseca son necesarias para la rápida formación del coágulo en el lugar de la herida.

Factor XIII: La trombina también activa el FXIII, la transglutaminasa (véase Figura 23.46). La **protransglutaminasa** se encuentra tanto en el plasma como en las plaquetas. La forma estructural del enzima plaquetario es α_2, mientras que su forma plasmática es $\alpha_2\beta_2$. La trombina activa FXIII a través del corte específico de un enlace peptídico en la subunidad α, tanto de la forma plaquetaria como de la plasmática de la transglutaminasa. El corte de la subunidad α de la forma plasmática del enzima produce la disociación de la subunidad β, que no es catalíticamente activa. La forma plaquetaria del enzima se libera en el sitio donde se produce la agregación de fibrina y se activa tan sólo por el corte de un enlace de la subunidad α.

Quininógeno de elevada masa molecular (HMWK): Dos de las proteínas que intervienen en la ruta intrínseca circulan en la sangre como complejos independientes con HMWK, la precalicreína y el FXI. Una molécula de HMWK se une a una de estas dos proteínas formando un complejo FXI-HMWK o un complejo pre-

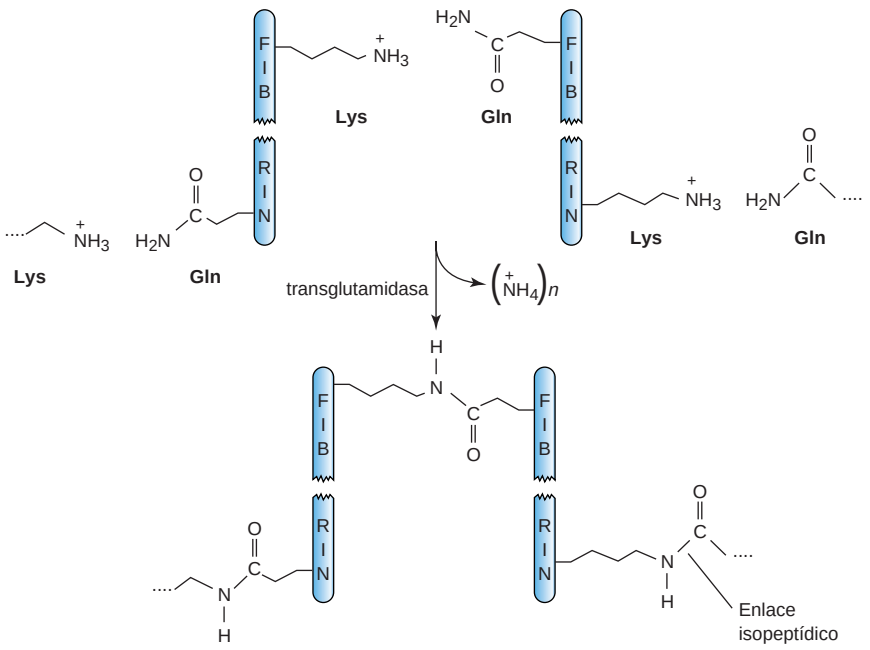


FIGURA 23.44
Reacciones catalizadas por la transglutaminasa.

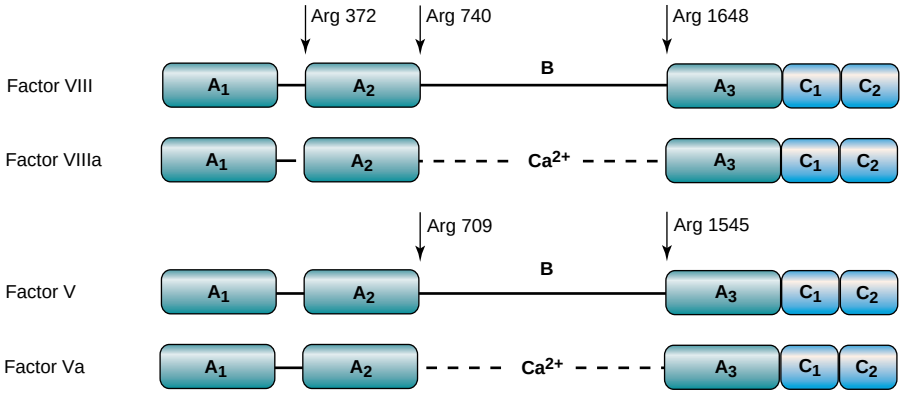


FIGURA 23.45
Organización estructural de los cofactores proteicos VIII y V.
Se muestran las posiciones de corte por la trombina. Las letras A y C indican dominios estructurales.
Adaptado de Kalafatis, M., Swords, N. A., Rand, M. D. y Mann, K. G. Biochim. Biophys. Acta *1227:113, 1994.*

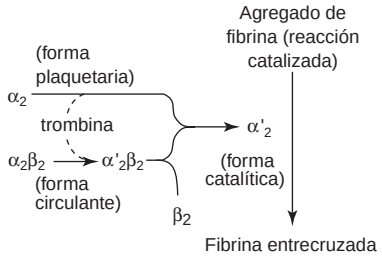
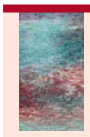


FIGURA 23.46
Activación de la transglutaminasa por la trombina.

calicreína-HMWK. En la Figura 23.47 se muestra un esquema en el que se indican las regiones funcionales del HMWK. El lugar de unión en el HMWK para la precalicreína está formado por unos 31 aminoácidos. El FXI se une a unos 58 residuos que incluyen los 31 a los que se une la precalicreína. La precalicreína es una proteína de 619 aminoácidos. El FXIIa convierte la precalicreína en calicreína por rotura del enlace Arg^{371}–Ile^{372}. La calicreína contiene dos cadenas unidas covalentemente por un único puente disulfuro. El dominio C-terminal de 248 aminoácidos contiene el sitio catalítico.

Formación del tapón plaquetario

La agregación de plaquetas en el lugar de la herida está mediada por la trombina. Existe un **receptor de trombina**, miembro de la familia de receptores con siete dominios transmembrana, en las células endoteliales. Este receptor queda expuesto tras la herida y se activa por la α-trombina. La agregación de plaquetas se ve favorecida por su unión inicial a este receptor activado. Además de la formación de un tapón físico, las plaquetas sufren un cambio morfológico y liberan otras sustancias



APLICACIÓN CLÍNICA 23.13
Hemofilia clásica

La hemofilia es una enfermedad hereditaria caracterizada por una tendencia permanente a hemorragias espontáneas o traumáticas, debidas a un sistema de coagulación de la sangre defectuoso. La hemofilia clásica es la hemofilia A, una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, en la que se produce una deficiencia del factor de coagulación VIII. Aproximadamente 1 de cada 10 000 varones nace con una deficiencia del factor VIII. De los aproximadamente 25 000 hemofílicos existentes en los Estados Unidos, más del 80% son del tipo A. La hemofilia B se debe a una disfunción del factor IX.

Algunos pacientes con hemofilia A pueden presentar un tiempo de protrombina normal si la concentración de factor tisular es alta. Una posible explicación de ello se encuentra en el hecho de que en el plasma humano la concentración de factor V es mucho más baja que la de factor X. La activación de una cantidad de factor X a Xa en exceso respecto al requerido para unirse a todo el factor Va disponible iniciaría la coagulación de la sangre a través de la ruta extrínseca, dando tiempos de protrombina normales. La ruta intrínseca no funcionaría normalmente debido a la deficiencia en factor VIII. Sin la participación conjunta de las dos rutas, el proceso global de coagulación estaría desequilibrado. Tanto el factor Xa como la trombina activan el factor V. Asimismo, ambos están involucrados en otras diversas reacciones. Si el proceso global no es acelerado desde el principio gracias a la intervención de la ruta intrínseca, debido a la cinética de interacción de la trombina y el factor Xa con la normalmente baja concentración de factor V, aparece entonces el problema de coagulación. Los pacientes de hemofilia A gravemente afectados presentan niveles sanguíneos de factor VIII inferiores al 5% del normal. Estos pacientes se han tratado generalmente con transfusiones de sangre, con los diversos riesgos asociados a las transfusiones, que incluyen la posibilidad de contraer hepatitis o VIH. También un número significativo de pacientes (~ 6%) desarrollan autoanticuerpos. Como resultado de la clonación y expresión del gen del factor VIII, el tratamiento de estos pacientes ha pasado a ser mucho más seguro. La proteína pura puede administrarse a los pacientes sin correr ninguno de los riesgos asociados a la transfusión anteriormente mencionados.

Nemerson, Y. *Tissue factor and hemostasis.* Blood 71:1, 1988.

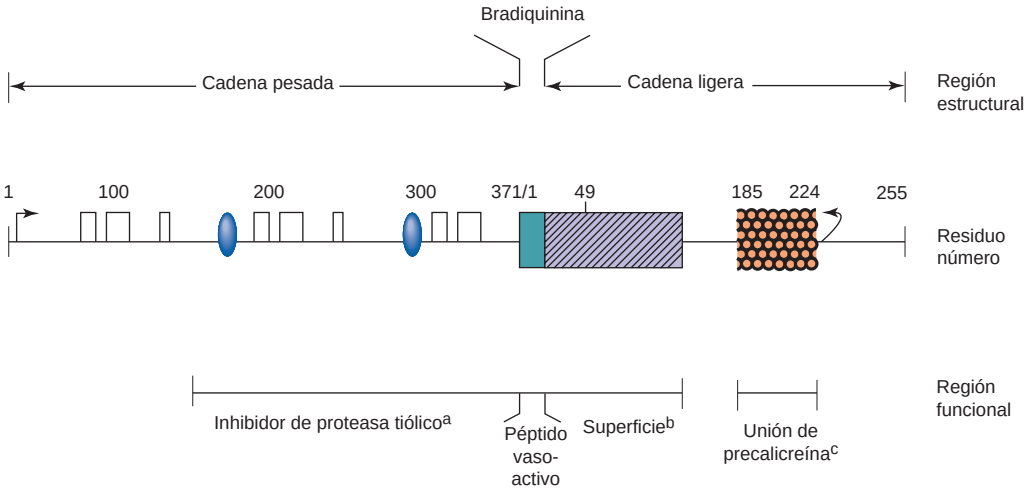


FIGURA 23.47
Diagrama de las regiones funcionales del quininógeno de elevada masa molecular humano (HMWK).
La bradiquinina se origina a partir de la región central del HMWK por proteólisis. Las dos cadenas resultantes se mantienen unidas mediante puentes disulfuro (flechas horizontales). *Adaptado de Tait, J. F. y Fujikawa, K.* J. Biol. Chem. *261:15396, 1986.*

tales como ADP, serotonina, algunos fosfolípidos, y proteínas que contribuyen a la coagulación y al proceso de reparación del tejido (véase Figura 23.48). Se libera una glucoproteína, el factor de von Willebrand (vWF), que se concentra en el área de la herida y forma una unión entre el receptor expuesto y las plaquetas. El factor de von Willebrand también ejerce de transportador del FVIII.

Con la liberación de ADP y **tromboxano A_2**, el proceso de agregación de las plaquetas pasa a ser autocatalítico. El FIV plaquetario, una **proteína que une heparina**, impide que se formen prematuramente complejos heparina-antitrombina III y atrae células con actividad antiinflamatoria hasta el lugar de la herida. Alrededor de un 20% del FV y una forma del FXIII, la transglutaminasa, se encuentra en las pla-

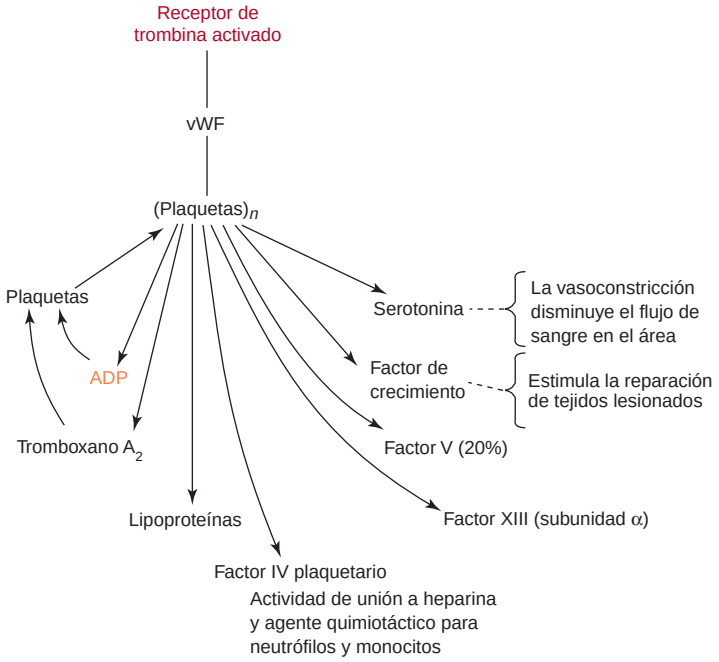


FIGURA 23.48
Acción de las plaquetas en la coagulación de la sangre.

quetas. El endotelio vascular intacto normal no inicia por lo general la agregación de las plaquetas debido a que los receptores y otros elementos no están expuestos, y activadores tales como el ADP se degradan rápidamente, o ni siquiera se encuentran en la sangre en concentración suficiente para ser efectivos. El endotelio secreta también **prostaciclina (PGI_2)**, un potente inhibidor de la agregación de las plaquetas.

Fase de anticoagulación de la hemostasis (Fase 2)

La inhibición de las proteasas es un proceso cinético que se inicia casi al mismo tiempo que el propio proceso de coagulación. Inicialmente, la formación de los complejos inhibidores es lenta porque las concentraciones de los enzimas con los que interaccionan los inhibidores son bajas. A medida que la activación de los enzimas avanza, la inhibición aumenta y se vuelve más importante. Estas reacciones, junto con las que conducen a la destrucción de cofactores proteicos, llegan a detener por completo el proceso de coagulación. En general, los **complejos proteasa–inhibidor** no se disocian fácilmente y se eliminan intactos de la sangre a través del hígado.

Inhibición de la ruta extrínseca

La inhibición de la ruta extrínseca, es decir, del complejo TF–FVIIa–Ca^{2+}–FXa, es único y requiere la interacción específica con un **inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI)**, conocido también como **inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína (LACI)**, y como **anticonvertina**. El TFPI es una proteína de 32 kDa que contiene tres dominios en tándem (véase Figura 23.49). Cada dominio es un inhibidor de proteasa funcionalmente homólogo que se asemeja a otros inhibidores de proteasa individuales, tales como el **inhibidor de tripsina de páncreas** bovino. El TFPI inhibe la ruta extrínseca interaccionando específicamente con el complejo TF–FVIIa–Ca^{2+}–FXa. El dominio 1 se une al FXa y el dominio 2 se une al FVIIa del complejo. La unión de TFPI a FVIIa se produce solamente en presencia de FXa. Hay dos aspectos de la acción del TFPI que merecen destacarse. El primero es que el TFPI es un inhibidor multienzimático en el que cada dominio por separado inhibe la acción de uno de los enzimas del complejo multienzimático de la ruta extrínseca. El segundo es que el complejo TFPI-FXa interviene en la internalización de FVIIa a través de un mecanismo de endocitosis. El dominio C terminal (tercer dominio) de TFPI parece ser necesario para que tenga lugar este proceso de internalización. La mayor parte del FVIIa se degrada en el interior de las células, pero una pequeña parte vuelve a la superficie como proteína intacta y es aparentemente una de las fuentes de FVIIa circulante. Como se ha descrito anteriormente, el FVIIa no tiene efectos perjudiciales ya que sólo es activo como proteasa en complejo con el TF.

Otros inhibidores de proteasas presentes en la sangre interaccionan con otros enzimas del sistema de la coagulación sanguínea. La mayoría de estos inhibidores pertenecen a la familia de proteínas de los **inhibidores de serina proteasas (serpinas)**. Existe una similitud en las estructuras terciarias de los miembros de esta familia, con un dominio central común de unos 350 aminoácidos.

La **antitrombina III (AT3)** es una de las principales serpinas e inhibe varias de las serina proteasas del sistema de la coagulación, y con la mayor especificidad la trombina y el FXa. La AT3 inhibe la trombina y el FXa mediante mecanismos diferentes, en los cuales interviene en ambos la interacción con la heparina. La heparina es un oligosacárido altamente sulfatado del tipo de los glucosaminoglucanos. Normalmente existe como una mezcla de oligosacáridos que cubre un intervalo de tamaños moleculares. La inhibición de la trombina por AT3 tiene lugar en un complejo ternario de AT3, heparina y trombina. La interacción con la heparina en este complejo depende del tamaño. Se necesitan por lo menos 18 unidades de monosacárido para la formación efectiva de este complejo de trombina inhibida:

$$\text{trombina} + \text{heparina}_{(>18)} + \text{AT3} \rightarrow \text{AT3:heparina}_{(>18)}\text{: trombina}_{(\text{inactiva})}$$

AT3 también forma complejo con una forma pentasacárida específica de la heparina. La estructura de este pentasacárido se muestra en la Figura 23.50. En las Figuras 23.51*a* y 23.51*b* se muestran modelos estructurales de AT3 aislada y unida a este pentasacárido de heparina, respectivamente. Esta última estructura es suficiente para inhibir el FXa

$$\text{AT3} + \text{heparina}_{(5)} \rightarrow \text{AT3:heparina}_{(5)} \xrightarrow{\text{FXa}} \text{AT3:heparina}_{(5)}\text{:FX}_{\text{inh}}$$

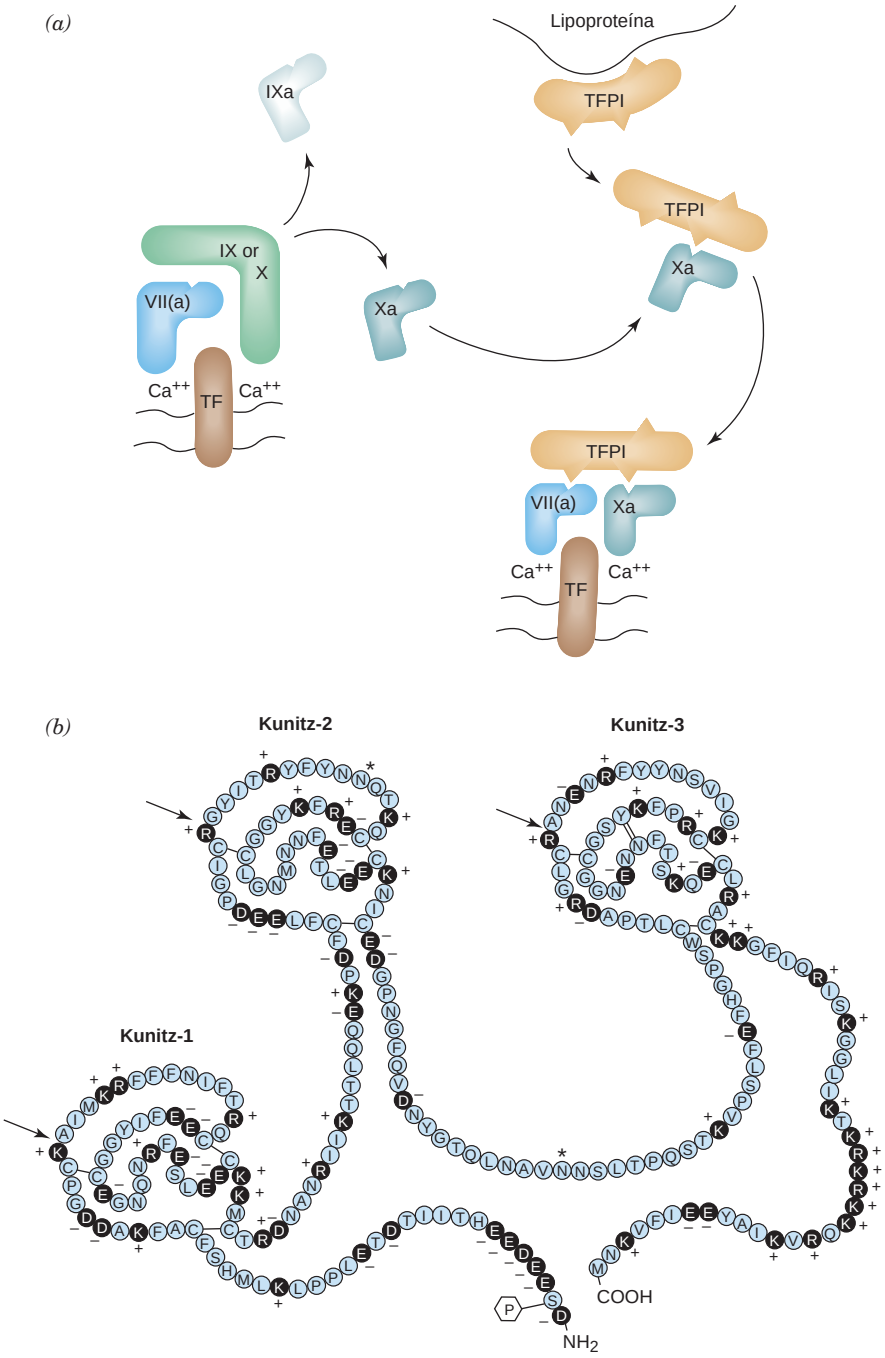


FIGURA 23.49
Mecanismo propuesto de la inhibición de la ruta extrínseca.
TFPI es el inhibidor de la ruta del factor tisular, cuya estructura se muestra en (*b*). El dominio 1 de Kunitz inhibe el factor VIIa, y el dominio 2 de Kunitz inhibe el factor Xa. El dominio 3 es necesario para la endocitosis del complejo. Las flechas indican la posible localización de la región inhibidora del sitio activo para cada dominio.
Tomado de Brooze, G. J., Girard, T. J. y Novotny, W. F. Biochemistry *29:7539, 1990. Copyright (1990) American Chemical Society.*

Aunque AT3 puede inhibir la trombina y el FXa en ausencia de heparina, la heparina favorece la inhibición de la trombina por un factor de aproximadamente 9 000 y la inhibición del FXa por un factor de aproximadamente 17 000.

Hay otra ruta para la inhibición de FXa. La sangre contiene una glucoproteína de 62-kDa, denominada **proteína Z (PZ)**, que contiene residuos de Gla en una estructura similar a otras proteasas que contienen Gla. La proteína Z, sin embargo, no posee actividad proteasa. En presencia de Ca^{2+} puede interaccionar con la membrana y formar un complejo con otra proteína plasmática, el **inhibidor de proteasa dependiente de proteína Z (ZPI)**, que inhibe el FXa.

$$FXa + Ca^{2+} + PZ + ZPI \rightarrow (Ca^{2+}{:}PZ){:}ZPI{:}FX_{inh}$$

El inhibidor de proteasa dependiente de proteína Z, de 72 kDa, posee una elevada afinidad por FXa, pero no por otras proteasas, incluídas la trombina, FVIIa, FIXa, y proteína C.

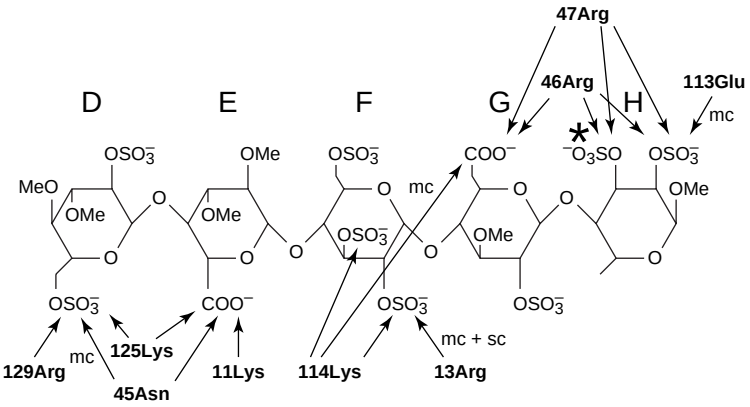


FIGURA 23.50
Estructura química del pentasacárido de heparina y sus interacciones con la antitrombina.
Tomado con permiso de Whisstock, J. C., Pike, R. N., Jin, L., et al. J. Mol. Biol. *301:1287, 2000.*

Inactivación de FVa y FVIIIa

Otra proteína involucrada en el proceso de anticoagulación es la **proteína C (PC)**. La proteína C, una proteína que contiene residuos Gla, se activa en un complejo de trombina unido a membrana, la **trombomodulina**, y Ca^{2+}. La proteína C, en presencia de otro cofactor proteico, la **proteína S (PS)**, inhibe la coagulación a través de la inactivación de los factores Va y VIIIa. La proteína S es una proteína de 75 kDa que contiene Gla. La carencia o mutaciones en la proteína S o la proteína C da lu-

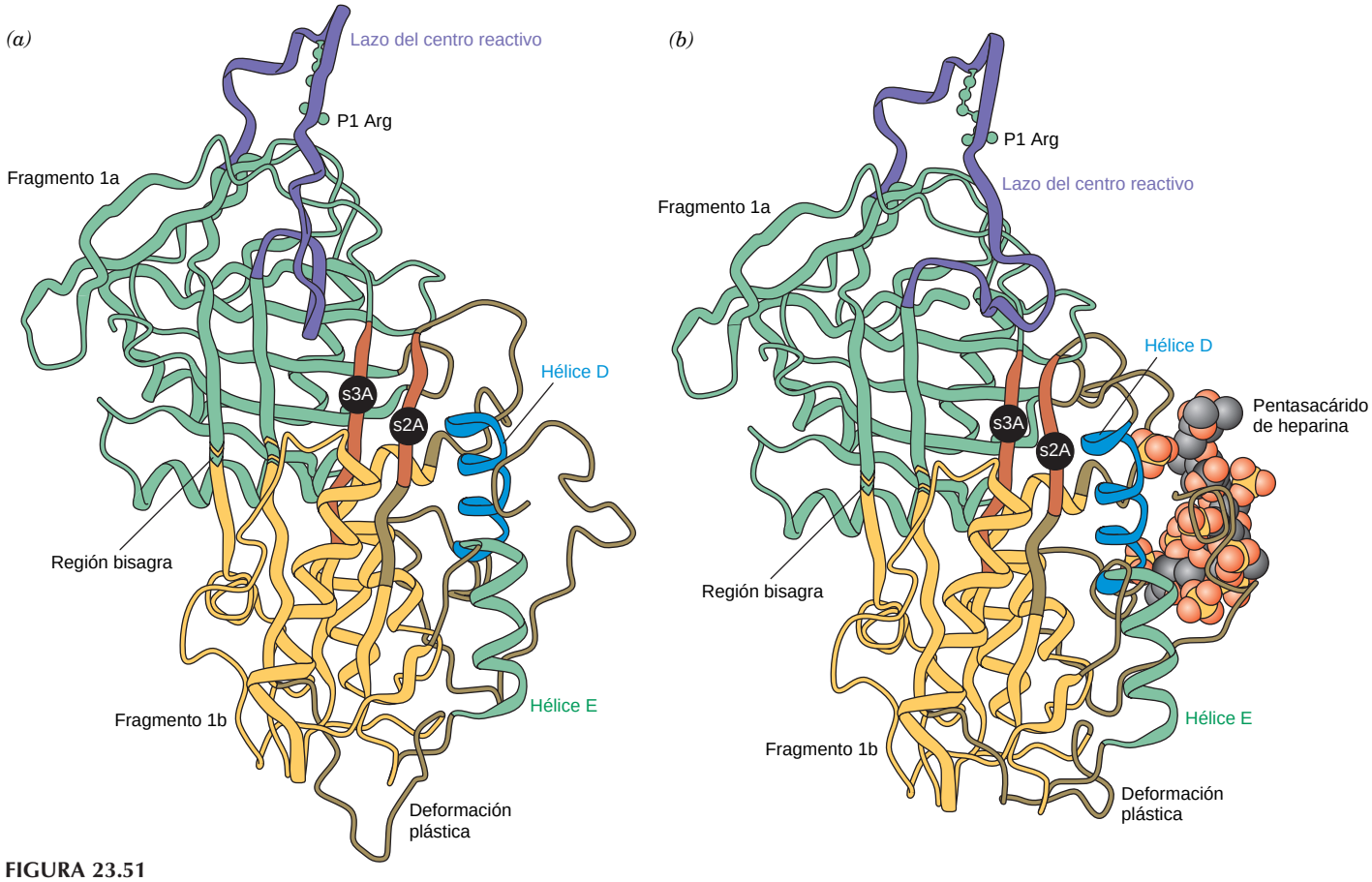
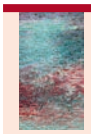


FIGURA 23.51
Fragmentos de la antitrombina a los que se une el pentasacárido de heparina.
Fragmento (*a*) en ausencia del pentasacárido de heparina y (*b*) en presencia del pentasacárido de heparina.
Tomado con permiso de Whisstock, J. C., Pike, R. N., Jin, L., et al. J. Mol. Biol. *301:1287, 2000.*



APLICACIÓN CLÍNICA 23.14
Trombosis y alteraciones en la ruta de la proteína C

En la acción de la proteína C sobre la regulación de la coagulación sanguínea intervienen cuatro proteínas principales: la propia proteína C; la proteína S, que es un cofactor de la proteína C; el factor Va; y el factor VIIIa. Los dos últimos son sustratos de la acción catalítica del complejo proteína C–proteína S. Las mutaciones, generalmente heredadas, en cualquiera de ellas, pueden originar trombosis venosas con distintos niveles de gravedad.

También se han identificado mutaciones *de novo* en pacientes con deficiencia de proteína C de tipo I. Una de las mutaciones era resultado de una transición de T a C, con cambio de sentido, que daba lugar a un cambio del codón para el aminoácido 270, de TCG a CCG. Ello colocaba Pro en lugar de Ser en esta posición, y el resultado era un cambio conformacional que afectaba a la actividad. El gen de la proteína C se encuentra en el cromosoma 2 y posee 9 exones y 8 intrones. En otro paciente se detectó una mutación *de novo* localizada en la unión entre el exón VI y el intrón f. Tenía lugar una deleción de 5 pb (subrayada en la figura), lo cual daba lugar a que algunas secciones del intrón fueran "leídas".

Exón VI <> Intrón f

Secuencia normal: **CAC CCC GCA G**<>GTGAGAAGCCCCCAATAT---
His Pro Ala

Secuencia mutada: **CAC CCC GCA** GGA GCC CCC AAT AT---
His Pro Ala Gly Ala Pro Asn -----

La secuencia traducida de forma normal se indica en negrita. La gravedad de la trombosis depende de si el gen del otro progenitor es normal y de su nivel de expresión.

Como resultado de mutaciones puntuales en los sustratos de la proteína C, el factor Va y el factor Xa, se puede dar una resistencia a la acción de la proteína C activada. Esto evita o retarda su inactivación por la acción proteolítica de la proteína C. La que se ha identificado como causa más común de la resistencia heredada a la acción de la proteína C activada es una mutación puntual en el gen del factor V, R506Q, denominada también FV-Leiden.

Una tercera causa de trombosis relacionadas con la proteína C es una alteración en la proteína S. Existen menos detalles específicos que permitan definir el mecanismo de interacción entre la proteína C y la proteína S, y por consiguiente, de las mutaciones que afectan su función. Sin embargo, parece claro que la falta de proteína S produce episodios trombóticos. Las trombosis venosas se dan en casi la mitad de los pacientes en algún momento de su vida si existe una carencia en las cantidades funcionales de proteína S.

Gandrille, S., Jude, B., Alhenc-gelas, H., et al. First *de novo* mutations in the protein C gene of two patients with type I deficiency: a missense mutation and a splice site deletion. *Blood* 84:2566, 1994; Zoller, B., Bernts dotter, A., Garcia de Frutos, P., et al. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 85:3518, 1995; Reitsma, P. H., Bernardi., F., Deig, R. G., et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. *Thromb. Haemost.* 73:876, 1995; e Irani-Hakime, N., Tamim, H., Kreidy, R. y Almawi, W. Y. The prevalence of factor V R506Q mutation-Leiden among apparently healthy Lebanese. *Am. J. Hematol.* 65:45, 2000.

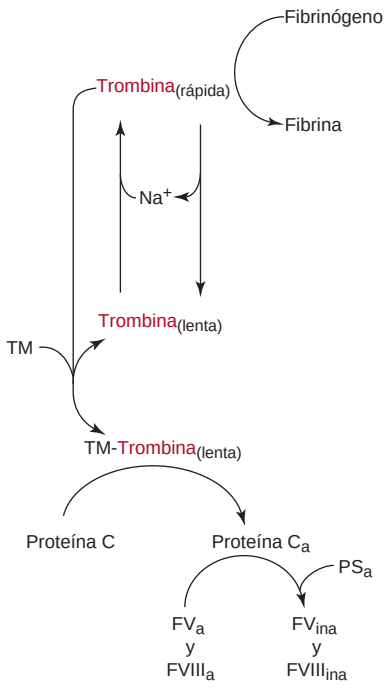


FIGURA 23.52
Reacciones alostéricas de la trombina y su acción sobre el fibrinógeno y la proteína C.

gar a **enfermedades trombóticas** (véase Apli. Clín. 23.14). La inactivacón de FVa y FVIIIa por la proteína C tiene lugar por rotura de enlaces peptídicos en residuos de arginina específicos

$$\text{Va y VIIIa} \xrightarrow{\text{PC:PS}} \text{V}_{\text{inh}} \text{ y VIII}_{\text{inh}}$$

La trombomodulina es una glucoproteína integral de la membrana de las células endoteliales. Contiene 560 aminoácidos y presenta homología en la secuencia con el receptor de la lipoproteína de baja densidad, pero muy poca con el factor tisular. Sin embargo, hay gran similitud entre los dominios funcionales del factor tisular y de la trombomodulina, actuando ambos como receptor y activador de una proteasa. La trombomodulina es un receptor de la trombina. En el complejo trombina-trombomodulina-Ca^{2+}, la trombina posee una menor especificidad para el fibrinógeno, y una especificidad mayor para la proteína C. Así, el papel de la trombina cambia de la procoagulación a la anticoagulación.

La trombina (Figura 23.52) puede existir *in vitro* en dos conformaciones: una de ellas se estabiliza mediante Na^+ y tiene una gran especificidad para catalizar la conversión del fibrinógeno en fibrina; la otra conformación predomina en ausencia de sodio, su especificidad para la conversión del fibrinógeno es baja, pero es elevada para la unión a trombomodulina y para la actividad sobre la proteína C. Estas formas se denominan "rápida" y "lenta", respectivamente. Este mecanismo de "retroalimentación" dinámica es importante para detener el proceso de coagulación en el propio punto de origen. Está claro que la trombina desempeña este papel dual, pero el papel del Na^+ en este proceso *in vivo* no está claro.

Existe también un inhibidor específico para la proteína C. El **inhibidor de proteína C (PCI)** se ha encontrado en plasma, plaquetas y células megacariocíticas. Alrededor del 30% del PCI es liberado por las plaquetas tras la estimulación con ADP, adrenalina, trombina y otras moléculas que estimulan la actividad de las plaquetas.

La inactivación de la proteína C activada (APC) por el PCI tiene lugar en la superficie de las membranas, como la mayor parte de las otras reacciones tratadas.

Fase de fibrinólisis de la hemostasis (Fase 3)

La fibrinólisis requiere plasminógeno y activador tisular del plasminógeno (t-PA) para producir plasmina

En la Figura 23.53 se muestran las reacciones de la fibrinólisis. La lisis del coágulo de fibrina se produce por acción del enzima plasmina, que se forma a partir del plasminógeno por la acción del **activador tisular del plasminógeno** (**t-PA** o **TPA**). El plasminógeno tiene una elevada afinidad por el coágulo de fibrina y forma complejos con la fibrina a través de varias regiones de la malla de fibrina. El t-PA también se une al coágulo de fibrina y activa el plasminógeno a plasmina, rompiendo enlaces específicos. A continuación, el coágulo se disuelve por acción de la plasmina.

El t-PA es una proteína de 72 kDa con varios dominios funcionales. Cerca de su N-terminal tiene un dominio de factor de crecimiento, dos **dominios de Kringle** adyacentes que interaccionan con la fibrina, y un dominio con actividad proteasa cerca de su extremo C-terminal. Los dominios de Kringle son secuencias conservadas que se pliegan formando grandes lazos estabilizados por puentes disulfuro. Estos dominios son estructuras importantes para las interacciones proteína–proteína que se producen con varios factores de coagulación. El t-PA se activa por la rotura de un enlace entre Arg–Ile, lo cual da lugar a una molécula con una cadena ligera y otra pesada. La actividad serina proteasa se localiza en la cadena ligera.

La actividad del t-PA también está regulada por acción de inhibidores proteicos. Se han identificado cuatro tipos de inhibidores inmunológicamente distintos, de los que dos tienen un significado fisiológico más importante, ya que reaccionan rápidamente con el t-PA y son específicos para éste. Son el **inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1)**, y el **inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 2 (PAI-2)**. El PAI-2 humano es una proteína de 415 aminoácidos.

El inicio y la terminación de la coagulación de la sangre siguen esencialmente el mismo tipo de proceso: interacción entre proteínas, formación de complejos multienzimáticos y proteólisis. Ambos son procesos que se dan en un sentido, y el único mecanismo para reemplazar las proteínas después de su utilización es la resíntesis.

Papel de los residuos de Gla en los factores de coagulación sanguínea

La modificación post-traducción de muchas de las proteínas que intervienen en la coagulación de la sangre que tiene como resultado la formación de residuos de γ-carboxiglutamato (Gla) las transforma en excelentes quelantes para los iones calcio. El Ca^{2+} realiza al menos dos funciones importantes en el proceso de coagulación de la sangre. Forma complejos con los residuos de Gla de estos factores e induce estados conformacionales y electrónicos que facilitan su interacción con

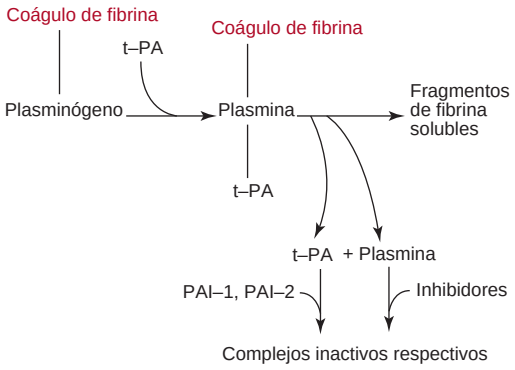


FIGURA 23.53
Reacciones implicadas en la disolución del coágulo.

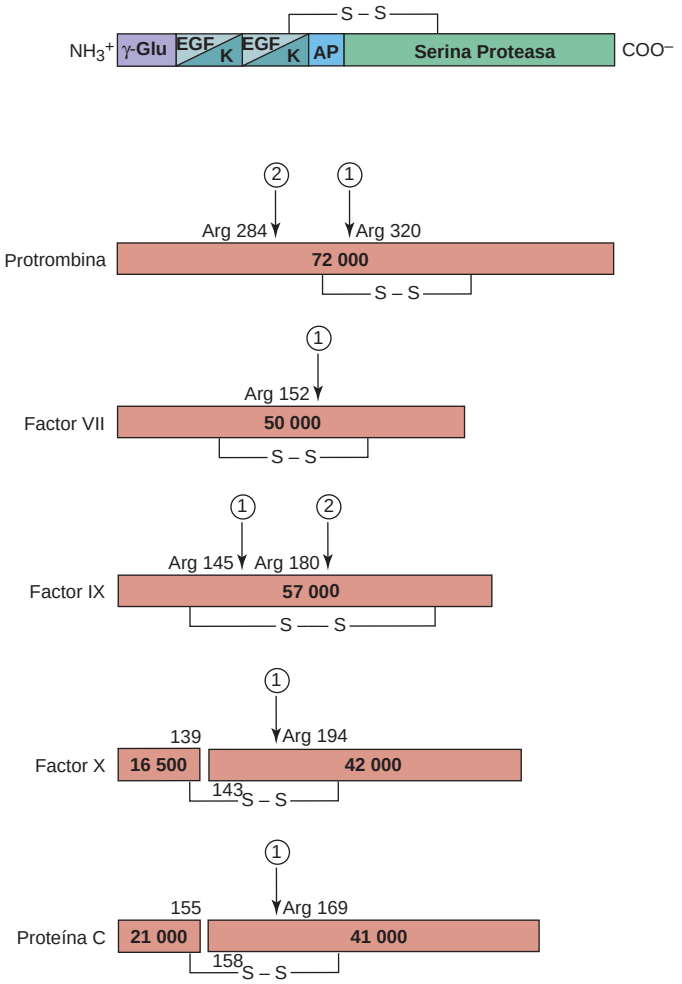


FIGURA 23.54
(*a*) Estructura general de las proteínas que contienen γ-carboxiglutámico y (*b*) organización estructural de los zimógenos y sitios de corte para su activación.

"receptores" de membrana. El Ca^{2+} también se une a otros sitios distintos de los asociados a residuos Gla, provocando cambios conformacionales en las proteínas, los cuales potencian la actividad catalítica de éstas. Se han obtenido datos acerca de este segundo papel del Ca^{2+} a partir de la observación de que la activación de al menos uno de los enzimas conlleva el corte y la eliminación de la región N-terminal que contiene los residuos Gla, pero se siguen requiriendo iones calcio para su participación efectiva en la coagulación de la sangre.

En la Figura 23.54 se muestra un esquema de la organización estructural de cinco de las **proteínas que contienen Gla** que se citan en la Tabla 23.9. Los residuos de Gla se localizan en la región N-terminal de las moléculas y vienen seguidos de un componente estructural similar al factor de crecimiento epidérmico. La posición en la que se produce el corte proteolítico por proteasas activadoras la ocupa generalmente un aminoácido situado entre cisteínas que forman un puente disulfuro. La activación puede dar lugar o no a la pérdida de un pequeño péptido. Sólo en la protrombina la activación se produce por corte en el exterior de este puente disulfuro, dando lugar a la eliminación del péptido que contiene Gla (véase Figura 23.41). El factor VII se activa por rotura de un único enlace Arg^{152}–Ile^{153}. El factor IX se activa por cortes en las posiciones Arg^{145} y Arg^{180}, con la liberación de un péptido de unos 11 kDa. El factor X está formado por dos cadenas unidas por un puente disulfuro, y se activa mediante la rotura de su cadena pesada en Arg^{194}–Ile^{195}. Los residuos Gla se encuentran en la cadena ligera. La proteína C también está formada por una cadena pesada y una ligera, unidas por un puente disulfuro. El corte de un enlace Arg–Ile en la posición 169 da lugar a su activación.

Papel de la vitamina K en las reacciones de las carboxilasas de proteínas

La modificación de la protrombina, de la **proteína C**, de la **proteína S**, de la **proteína Z** y de los factores VII, IX y X para introducir residuos Gla tiene lugar durante la síntesis por acción de una carboxilasa localizada en el lado de la luz del retículo endoplasmático rugoso. La **vitamina K** (fitonadiona, la vitamina de la "koagulación") es un cofactor esencial para esta carboxilasa. Durante el curso de la reacción, la dihidroquinona o forma reducida de la vitamina K (Figura 23.55), vitamina K(H_2), se oxida a la forma epóxido, vitamina K(O), por el O_2. Un mecanismo probable implica la adición de oxígeno molecular en la posición C-1 de la dihidrovitamina K y su posterior reordenamiento a la forma alcóxido, con un p$K_a \sim 20$. Este intermedio actúa de base fuerte y toma un protón del carbono γ-metileno del glutamato, dando lugar a un carbanión al que se puede adicionar CO_2 mediante un mecanismo nucleofílico (véase Figura 23.55). El **epóxido de la vitamina K** se reconvierte enzimáticamente en **dihidroquinona** mediante enzimas que requieren grupos ditiol, tales como la **tiorredoxina**, como cofactores. Análogos de la vita-

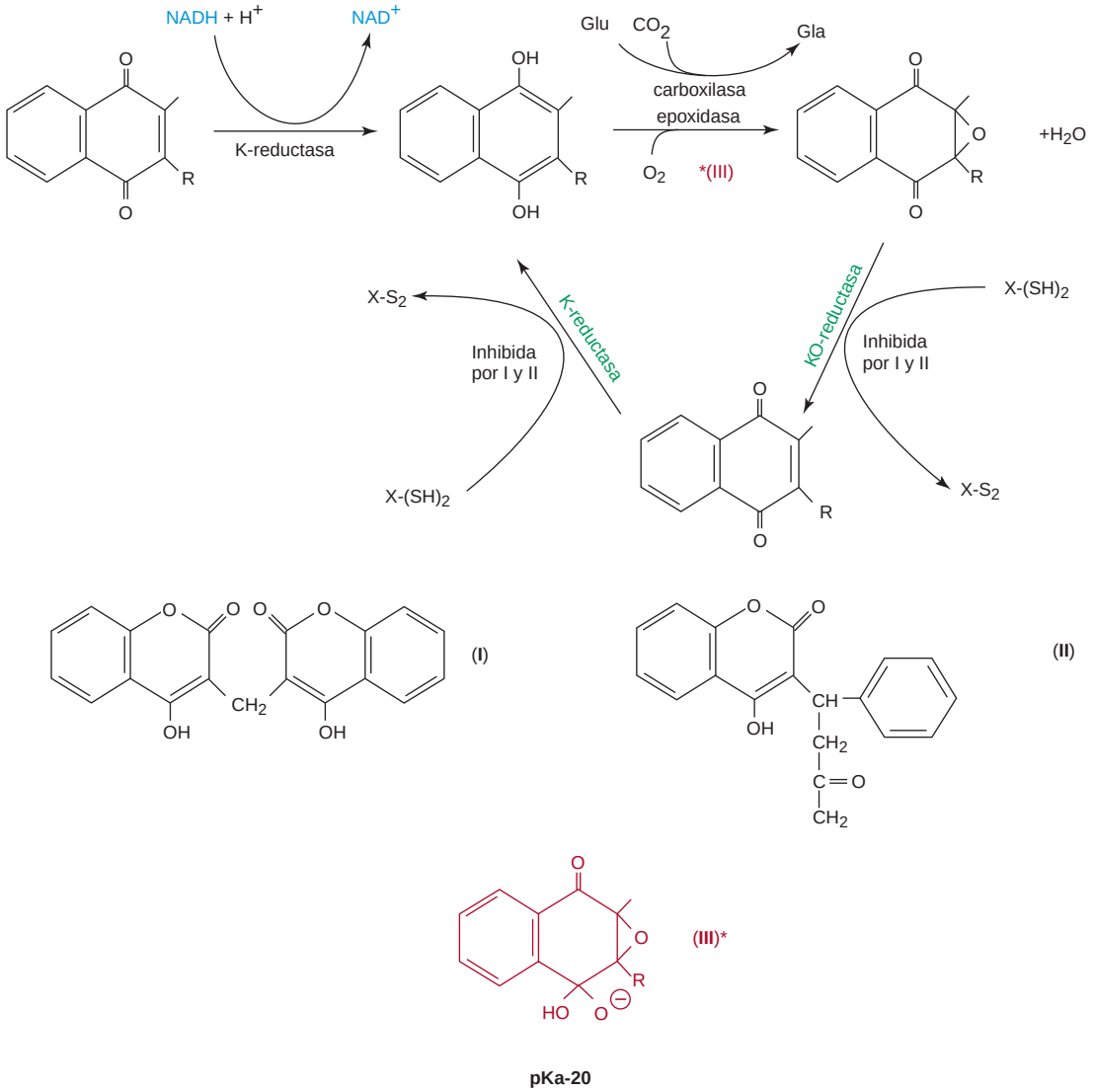
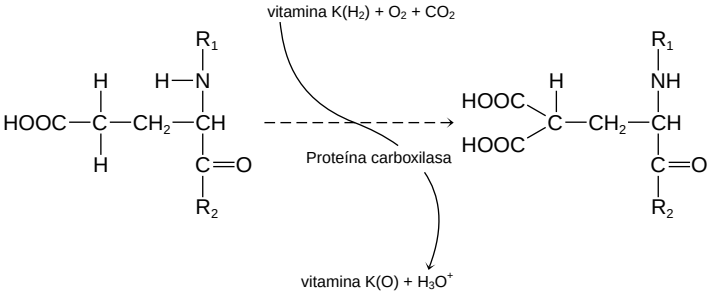


FIGURA 23.55
Ciclo de la vitamina K y su función en la reacción de carboxilación de glutámico en proteínas.
$X\text{-}(SH)_2$ y $X\text{-}S_2$ representan las formas reducida y oxidada, respectivamente, de la tiorredoxina. Las reductasas de vitamina K dependientes de ditiol y de NADH son enzimas distintos. Las reductasas K y KO dependientes de ditiol se inhiben con dicumarol (I) y warfarina (II). * Posible intermedio alcóxido (III).
Adaptado de Vermeer, C. Biochem. J. *266:625, 1990.*

mina K inhiben las reductasas de vitamina K dependientes de ditiol, y en consecuencia toda la vitamina K disponible se convierte a la forma epóxido, que no es funcional en esta reacción. La reacción de carboxilación global es



Las estructuras de dos análogos, el **dicumarol** y la **warfarina**, que interfieren en la acción de la vitamina K se muestran en la Figura 23.55. En animales tratados con estos compuestos, la protrombina, la proteína C, la proteína S, los factores VII, IX

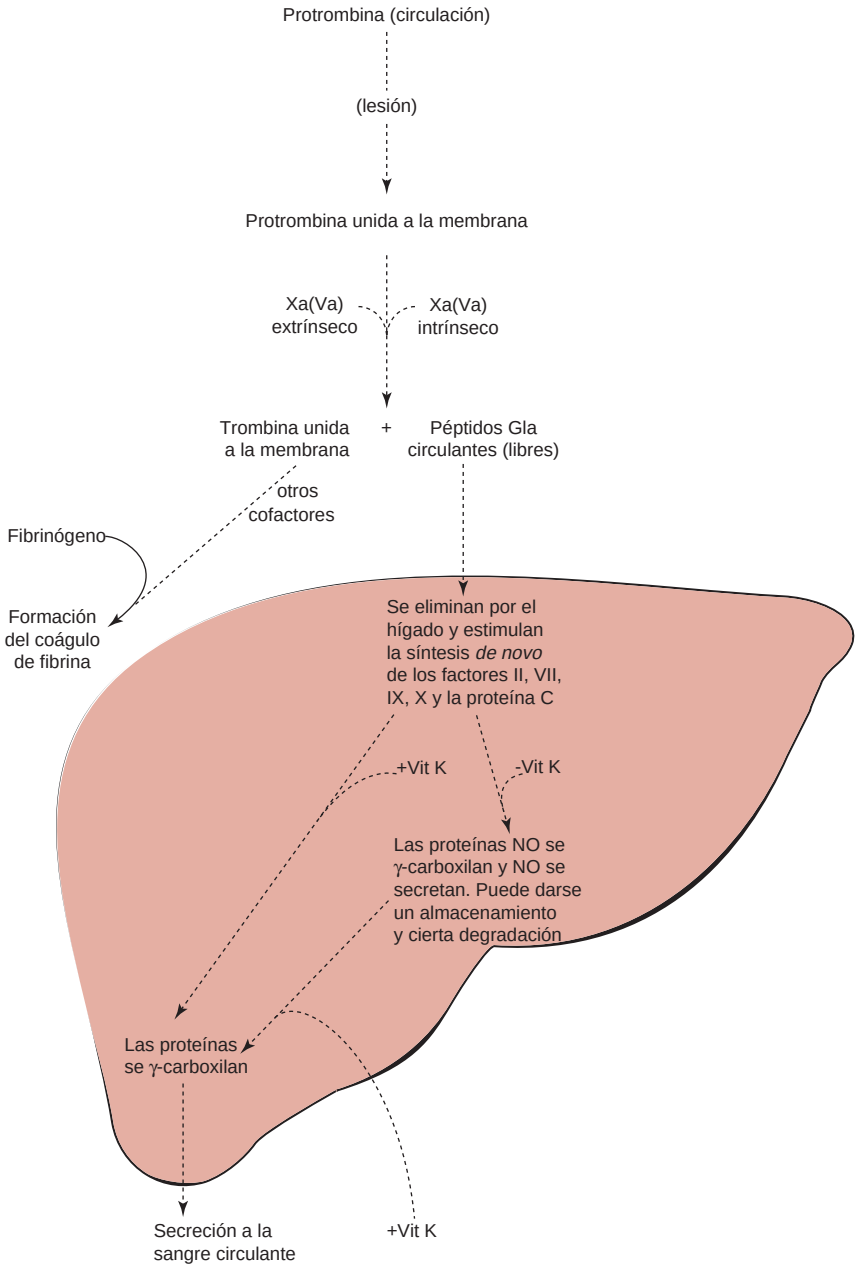


FIGURA 23.56
Papel de los péptidos-Gla en la regulación de la síntesis *de novo* de factores de coagulación.

y X y otras proteínas que contienen Gla no son modificadas post-traduccionalmente, son ineficaces en la unión de Ca^{2+} y no pueden participar en el proceso de coagulación de la sangre. El dicumarol y la warfarina no tienen ningún efecto sobre la coagulación en el tubo de ensayo.

Control de la síntesis de proteínas con Gla

El hígado elimina de la circulación los péptidos Gla que se liberan a partir de la protrombina, tras su activación. Estos péptidos N-terminales que contienen Gla estimulan la síntesis *de novo* de proteínas que necesitan Gla, pertenecientes al sistema de coagulación (véase Figura 23.56). Las proteínas se sintetizan incluso en ausencia de vitamina K, o en presencia de antagonistas de la vitamina K. Sin embargo, no se secretan a la circulación. Cuando se restablecen los niveles de vitamina K, o se añade ésta en concentración suficiente para sobrepasar los efectos de los antagonistas, las proteínas preformadas se carboxilan y se liberan a la circulación.

La activación de la coagulación de la sangre es un proceso que se da en un único sentido. La utilización de péptidos de activación liberados a partir de la protrombina, para indicar al hígado que debe sintetizar mayor cantidad de estas proteínas, es un mecanismo eficiente para mantener sus concentraciones sanguíneas en niveles efectivos. Se debe asegurar un seguimiento de los pacientes que se encuentran bajo tratamiento a largo plazo con antagonistas de la vitamina K para comprobar que los procesos de modificación post-traducción que dan lugar a las proteínas que contienen residuos Gla no se han detenido por completo. Cuando todos estos procesos funcionan bien se consigue la hemostasis.

BIBLIOGRAFÍA

General

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. *Molecular Biology of the Cell,* 3rd ed. New York: Garland Publishing, 1994.

Barany, M. (Ed.). *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction.* New York: Academic Press, 1996.

Nervio

Bennett, M. K. y Scheller, R. H. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2559, 1993.

Fried, G. Synaptic vesicles and release of transmitters: new insights at the molecular level. *Acta Physiol. Scand.* 154:1, 1995.

Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J. y Benfenati, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259:780, 1993.

Grenningloh, G., et al. The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328:215, 1987.

Goodman, S. R., Zimmer, W. E., Clark, M. B., Zegon, I. S., Barker, J. E. y Bloom, M. L. Brain spectrin: of mice and men. *Brain Res. Bull.* 36:593, 1995.

Pleribone, V. A., Shupllakov, O., Brodin, L., Hilfiker-Rothenfluh, S., Czernik, A. J. y Greengard, P. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375:493, 1995.

Sudhof, T. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions. *Nature* 375:645, 1995.

Taylor, P. The cholinesterases. *J. Biol. Chem.* 266:4025, 1991.

Visión

Abrahamson, E. W. y Ostroy, S. E. (Eds.). *Molecular Processes in Vision,* Benchmark Papers in Biochemistry/3. Stroudsburg, PA: Hutchinson Ross Publishing Company, 1981.

Farber, D. B. From mice to men: the cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease. *Invest. Ophthamol. Vis. Sci.* 36:263, 1995.

Nathans, J. Molecular biology of visual pigments. *Annu. Rev. Neurosci.* 10:163, 1987.

Nathans, J., et al. Molecular genetics of human blue cone monochromacy. *Science* 245:831, 1989.

Palczewski, K. Is vertebrate phototransduction solved? New insights into the molecular mechanism of phototransduction. *Invest. Ophthamol. Vis. Sci.* 35:3577, 1994.

Stryer, L. Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* 266:10711, 1991.

Zigler, J. S. Jr. y Goosey, J. Aging of protein molecules: lens crystallins as a model system. *Trends Biochem. Sci.* 7:133, 1981.

Músculo

Anderson, P. A. W., Malouf, N. N., Oakley, A. E., Pagani, E. D. y Allen, P. D. Troponin T isoform expression in humans: a comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ. Res.* 69:1226, 1991.

Carlier, M.-F. Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266:1, 1991.

da Silva, A. C. R. y Reinach, F. C. Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 16:53, 1991.

dos Remedios, C. G. y Moens, P. D. J. Actin and the actomyosin interface: a review. *Biochim. Biophys. Acta* 1228:99, 1995.

Ebashi, S. Excitation–contraction coupling and the mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Physiol.* 53:1, 1991.

Geeves, M. A. y Holmes, K. C. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* 68:687, 1999.

Gerisch, G., Noegel, A. A. y Schleicher, M. Genetic alteration of proteins in actin-based motility systems. *Annu. Rev. Psychol.* 53:607, 1991.

Hirose, K., Franzini-Armstrong, C., Goldman, Y. E. y Murray, J. M. Structural changes in muscle crossbridges accompanying force generation. *J. Cell Biol.* 127:763, 1994.

Huxley, H. E. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164:1356, 1969.

Lorenz, M., Popp, D. y Holmes, K. C. Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* 234:826, 1993.

Sangre

Antalis, T. M., et al. Cloning and expressing of a cDNA coding for a human monocyte-derived plasminogen activator inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:985, 1988.

Brummel, K. E., Butenas, S. y Mann, K. G. An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. *J. Biol. Chem.* 274:22862, 1999.

Butenas, S., van't Veer, C. y Mann, K. G. Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *J. Biol. Chem.* 272:21527, 1997.

Colombatti, A. y Bonaldo, P. The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* 77:2305, 1991.

Cooper, D. N. The molecular genetics of familial venous thrombosis. *Blood Rev.* 5:55, 1991.

Dowd, P., Hershline, R., Ham, S. W. y Naganathan, S. Vitamin K and energy transduction: a base strength amplification mechanism. *Science* 269:1684, 1995.

Fujimaki, K., Yamazaki, T., Taniwaki, M. y Ichinose, A. The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon. *Biochemistry* 37:6838, 1998.

Han, X., Fiehler, R. y Broze, G. J. Jr. Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9250, 1998.

Han, X., Huang, Z. F., Fiehler, R. y Broze, G. J. Jr. The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin. *Biochemistry* 38:11073, 1999.

Iakhiaev, A., Pendurthi, U. R., Voigt, J., Ezban, M. y Rao, L. V. M. Catabolism of factor VIIa bound to tissue factor fibroblasts in the presence and absence of tissue factor pathway inhibitor. *J. Biol. Chem.* 274:36995, 1999

Kalafatis, M., Sworde, N. A., Rand, M. D. y Mann, K. G. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1227:113, 1994.

Kuliopulus, A., Hubbard, B. R., Lam, Z., Koski, I. J., Furie, B., Furie, B. C. y Walsh, C. T. Dioxygen transfer during vitamin K-dependent carboxylase catalysis. *Biochemistry* 31:7722, 1992.

McClure, D. B., Walls, J. D. y Grinnell, B. W. Post-translational processing events in the secretion pathway of human protein C, a complex vitamin K-dependent antithrombotic factor. *J. Biol. Chem.* 267:19710, 1992.

Nishioka, J., Ning, M., Hayashi, T. y Suzuki, K. Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphotidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles. *J. Biol. Chem.* 273:11281, 1998.

Ny, T., Elgh, F. y Lund, B. The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of introns and exon structures to functional and structural domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5355, 1984.

Palston, P. A. y Gettings, P. G. W. A database of recombinant wild-type and mutant serpins. *Thromb. Haemost.* 72:166, 1994.

Reitsma, P. H., et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. *Thromb. Haemost.* 73:876, 1995.

Shriver, Z., Sundaram, M., Venkataraman, G., Fareed, J., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, R. Cleavage of the antithrombin III binding site in heparin by heparinases and its implication in the generation of low molecular weight heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10365, 2000.

Usalan, C., Erdem, Y., Altum, B., Arici, M., Haznedaroglu, I. C., Yasavul, U., Turgan, C. y Caglar, S. Protein Z levels in haemodialysis patients. *Int. Urol. Nephrol.* 31:541, 1999.

Van't Veer, C., Golden, N. J., Kalafatis, M. y Mann, K. G. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation: synergistic effect in combination with tissue factor inhibitor. *J. Biol. Chem.* 272:7983, 1997.

Vermeer, C. γ-Carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. J.* 266:625, 1990.

Yin, Z.-F., Huang, Z.-F., Cui, J., Fiehler, R., Lasky, N., Ginsburg, D. y Broze, G. J. Jr. Prothrombin phenotype of protein Z deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6734, 2000.

Zeheb, R. y Gelehrter, T. D. Cloning and sequencing of cDNA for the rat plasminogen activator inhibitor-1. *Gene* 73:459, 1988.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. En la propagación de un impulso nervioso por una señal eléctrica:
   A. el potencial eléctrico a través de la membrana, mantenido por la bomba de iones K^+ y Na^+ dependiente de ATP, se vuelve más negativo.
   B. la despolarización local de la membrana provoca cambios en la conformación proteica de los canales iónicos que permiten al K^+ y al Na^+ moverse a favor de sus gradientes de concentración.
   C. la propagación de la carga es bidireccional a lo largo del axón.
   D. los canales iónicos con "compuertas de voltaje" tienen un tiempo de recuperación finito, de manera que la amplitud del impulso varía a medida que se desplaza a lo largo del axón.
   E. los astrocitos son las protuberancias semejantes a antenas que reciben las señales procedentes de otras células.

2. Todas las siguientes son características de neurotransmisores no peptídicos EXCEPTO:
   A. transmiten la señal a través de las sinapsis entre células.
   B. han de producirse en el cuerpo de la célula y a continuación desplazarse a lo largo del axón hasta el terminal presináptico.
   C. la estimulación eléctrica que incrementa el Ca^{2+} en el terminal presináptico fomenta su liberación desde vesículas de almacenamiento.
   D. la unión a receptores en el terminal postsináptico induce un cambio conformacional en proteínas de esta membrana.
   E. su acción se termina mediante mecanismos específicos dentro de la unión sináptica.

3. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones acerca de los fenómenos bioquímicos que se producen en el ojo es cierta?
   A. en el cristalino la glucosa se metaboliza principalmente mediante el ciclo del TCA para proporcionar suficiente ATP para la Na^+, K^+–ATPasa.
   B. el control del nivel de glucosa en sangre a o por debajo de 110 mg dL^{-1} podría disminuir la incidencia de cataratas de tipo diabético al permitir la producción de sorbitol.
   C. la velocidad elevada de la ruta de las pentosas monofosfato en la córnea es necesaria para proporcionar NADPH como sustrato de la glutatión reductasa.
   D. la retina contiene mitocondrias, por lo que para su producción de ATP depende del ciclo del TCA.
   E. Las cataratas se producen por un aumento del flujo sanguíneo en el cristalino, lo que conduce a una desagregación de las proteínas del cristalino.

4. Todas las afirmaciones siguientes sobre la transducción de la señal lumínica por la rodopsina son ciertas EXCEPTO:
   A. la absorción de fotones de luz inicia la conversión de rodopsina en rodopsina activada.
   B. requiere la proteína G, transducina.
   C. la concentración de cGMP aumenta en presencia de un complejo GTP–transducina–rodopsina activado.
   D. la señal se suprime, en parte, por la actividad GTPasa de la subunidad α de la transducina.
   E. la concentración de calcio regula tanto la guanilato ciclasa como la fosfodiesterasa.

5. Todas las afirmaciones siguientes sobre la actina y la miosina son ciertas, EXCEPTO:
   A. la sección de la cabeza globular de la miosina posee dominios para la unión de ATP y actina.
   B. la actina es la principal proteína del filamento grueso.
   C. la unión de ATP al complejo actina–miosina induce la disociación de la actina y la miosina.
   D. la actina F, formada por agregación del complejo actina G–ATP–Mg^{2+}, se estabiliza cuando se le une la tropomiosina.
   E. la unión de calcio a la subunidad de la troponina de tipo calmodulina induce cambios conformacionales que permiten a la miosina unirse a la actina.

6. La concentración de ATP se mantiene relativamente constante durante la contracción muscular mediante:
   A. un aumento de la actividad metabólica.
   B. la acción de la adenilato quinasa.
   C. la acción de la creatina fosfoquinasa.
   D. todas las anteriores.
   E. ninguna de las anteriores.

7. La agregación de las plaquetas:
   A. se inicia por conversión de fibrinógeno a fibrina en el sitio donde se ha producido una herida.
   B. en vasos sanguíneos intactos está inhibida por la secreción de prostaciclina por el endotelio vascular intacto.
   C. produce cambios morfológicos y liberación del vasodilatador serotonina.
   D. está inhibida por la liberación de ADP y tromboxano A_2.
   E. está inhibida por el factor de von Willebrand (vWF).

8. En la formación de un coágulo de sangre:
   A. para formar fibrina a partir de fibrinógeno se requiere proteólisis de residuos de γ-carboxiglutamato.
   B. el coágulo se estabiliza mediante entrecruzamiento de moléculas de fibrina por acción del factor XIII, transglutaminasa.
   C. el único papel de la trombina está en la activación del factor VII
   D. para que se inicie el proceso de coagulación ha de inactivarse el factor tisular, factor III o TF.
   E. el papel del calcio consiste fundamentalmente en juntar moléculas de fibrina para que se forme el coágulo.

9. El factor Xa, necesario para la conversión de protrombina en trombina, se forma por acción del complejo TF–FVII–Ca^{2+} sobre el factor X:
   A. sólo en la ruta extrínseca de coagulación de la sangre.
   B. sólo en la ruta intrínseca de coagulación de la sangre.
   C. como parte de ambas rutas, la extrínseca y la intrínseca.
   D. sólo si está inhibida la cascada de coagulación normal.

10. La lisis del coágulo de fibrina:
    A. se encuentra en equilibrio con la formación del coágulo.
    B. se inicia cuando la plasmina se une al coágulo.
    C. necesita la hidrólisis de plasminógeno, para dar lugar a las cadenas pesada y ligera.
    D. está regulada por la acción de inhibidores de proteínas sobre el plasminógeno.
    E. requiere la conversión de plasminógeno en plasmina por el t-PA (activador del plasminógeno tisular).

Preguntas 11 y 12: Los genes que codifican las proteínas de los pigmentos visuales están localizadas en cromosomas diferentes. El gen de la rodopsina está en el tercer cromosoma; el gen del pigmento azul está en el séptimo cromosoma; y los genes de los pigmentos rojo y verde están en el cromosoma X. Las hembras tienen dos cromosomas X, de forma que las anomalías en la visión del color son raras, pero los machos tienen un único cromosoma X. Alrededor del 8% de los machos tiene visión del color anormal que afecta bien a la percepción del rojo o a la del verde o, raramente tanto a la percepción del rojo como a la del verde. Se conoce por lo menos un individuo que tiene ceguera del color azul.

11. Los conos de la retina:
    A. son los responsables de la visión del color.
    B. son mucho más numerosos que los bastones.
    C. tienen pigmentos sensibles a la luz roja, azul y verde que difieren entre sí por pequeñas diferencias en el grupo prostético del retinal.
    D. no utilizan transducina en la transducción de señal.
    E. están mejor dotados para discernir fenómenos visuales que cambian rápidamente debido a que un solo fotón de luz genera una corriente más intensa que la que se produce en los bastones.

12. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones sobre la rodopsina es cierta?
    A. la rodopsina es el fotorreceptor primario tanto de los bastones como de los conos.
    B. el grupo prostético de la rodopsina es el todo-*trans*-retinol que proviene de la rotura del β-caroteno.
    C. la conversión de rodopsina en rodopsina activada, R*, mediante un pulso lumínico requiere la despolarización de la célula.
    D. la rodopsina se encuentra en el citosol de la célula.
    E. la absorción de un fotón de luz por la rodopsina causa una isomerización del 11-*cis*-retinal a todo-*trans*-retinal.

Preguntas 13 y 14: Los canales iónicos del músculo cardíaco, como en otros tejidos, necesitan un tiempo de recuperación finito tras la excitación. El tiempo de recuperación entre las contracciones cardíacas se mide en un electrocardiograma como el intervalo QT. El inicio de la fase de excitación es la apertura de los canales de Na^+, que causa despolarización. A continuación se abren los canales de K^+ para permitir que el K^+ salga fuera de la célula, lo cual es un elemento clave para detener el potencial de acción. Existen defectos hereditarios en estos canales que causan un estado conocido como síndrome del QT largo (LQTS). El LQTS puede causar la muerte súbita, especialmente en personas jóvenes físicamente activas, que pueden incluso ignorar que tienen LQTS puesto que no han tenido previamente ningún síntoma de irregularidades cardíacas.

13. El impulso nervioso que inicia la contracción muscular:
    A. comienza con la unión de la acetilcolina a los receptores del retículo sarcoplasmático.
    B. provoca la hiperpolarización tanto de la membrana plasmática como de los túbulos transversales.
    C. provoca la apertura de los canales de calcio, que da lugar a un incremento de la concentración de calcio en el interior del sarcómero.
    D. evita que el Na^+ entre en el sarcómero.
    E. evita que el Ca^{2+} se una a la troponina C.

14. Cuando se contrae un músculo:
    A. se acortan los túbulos transversales, aproximando entre sí las miofibrillas y el retículo sarcoplasmático.
    B. se acortan los filamentos delgados y los filamentos gruesos del sarcómero.
    C. las cadenas ligeras se disocian de las cadenas pesadas de miosina.
    D. las bandas H y las bandas I de los sarcómeros se acortan porque los filamentos delgados y los filamentos gruesos se deslizan unos por delante de los otros.
    E. aumenta el entrecruzamiento de proteínas en los filamentos gruesos.

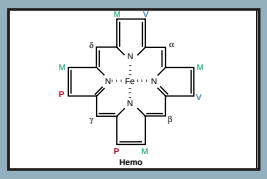
Problemas

15. En presencia de warfarina, un análogo de la vitamina K, varias proteínas de la ruta de la coagulación sanguínea son inefectivas porque no pueden unir Ca^{2+} eficientemente. ¿Por qué?

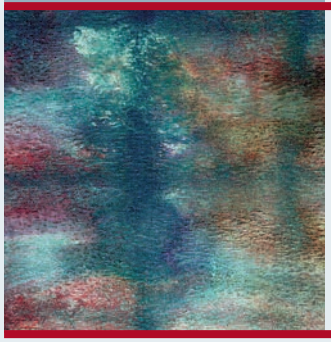
16. Los compuestos de tipo organofosfato son inhibidores irreversibles de la acetilcolinesterasa. ¿Qué efecto tiene un inhibidor organofosfato en la transmisión de los impulsos nerviosos?

RESPUESTAS

1. **B** Éste es el mecanismo de propagación del impulso. A: El potencial se hace menos negativo. C: es unidireccional. D: Los canales con "compuertas de voltaje" tienen un tiempo de recuperación finito, de manera que la amplitud se mantiene constante. E: Describe a las dendritas. Los astrocitos son células de la glía que están involucradas en procesos que aíslan las neuronas de su medio externo.
2. **B** Esto es cierto para los neuropéptidos, pero muchos neurotransmisores no peptídicos se sintetizan en el terminal presináptico. A: Ésta es una diferencia entre señales eléctricas y químicas. C: La sinapsina desempeña un papel en este proceso. E: Asegúrese de conocer los tres tipos de procesos involucrados.
3. **C** Asegúrese de entender el papel del glutatión en la protección contra subproductos nocivos procedentes del oxígeno atmosférico. A: En el cristalino, la mayor parte del ATP (85%) se genera por glucólisis. B: El control de la glucosa reduce la formación de sorbitol. D: El metabolismo de la retina es similar al de otros tejidos del ojo directamente involucrados en el proceso visual. Por lo tanto, su fuente de energía principal es la glucólisis. E: El cristalino no tiene aporte de sangre. En las cataratas derivadas de la diabetes hay una mayor agregación de las proteínas del cristalino debido al aumento de la concentración de sorbitol y la osmolaridad.
4. **C** El complejo de la transducina activa la fosfodiesterasa disminuyendo, por consiguiente, la [cGMP]. A: Este es un proceso muy rápido. B y D: La transducina cumple los criterios de una proteína G típica. E: Los enzimas se regulan por Ca^{2+} en direcciones opuestas, y, por lo tanto, se controla la [cGMP].
5. **B** La miosina forma el filamento grueso. La actina está en el filamento delgado. A: Ambos son importantes en el papel de la miosina. C: Obsérvese que el papel del ATP en la contracción es el de favorecer la disociación, no la formación, del complejo actina–miosina. D y E: La tropomiosina, la troponina y la actina son las tres proteínas principales del filamento. Sus acciones están estrechamente interconectadas.
6. **D** Asegúrese de conocer las reacciones catalizadas por estos dos enzimas.
7. **B** La naturaleza "ying–yang" del PGI_2 y del TXA_2 ayuda a controlar la agregación de las plaquetas hasta que haya necesidad de ello. A: El inicio se produce por contacto con un receptor activado en el lugar de la herida. La formación del coágulo requiere la activación de varios enzimas. C: La serotonina es un vasoconstrictor. La vasodilatación estaría contraindicada en esta situación. D: El TXA_2 facilita la agregación. E: El vWF forma una unión entre el receptor y las plaquetas, lo que promueve la agregación
8. **B** El entrecruzamiento se produce entre una glutamina y una lisina. A y E: Los residuos de γ-carboxiglutamato se encuentran en varios enzimas; unen calcio y facilitan la interacción de estas proteínas con las membranas que forman los sitios de inicio de la reacción. C: La trombina activa los factores V, VII, VIII y XIII y el fibrinógeno. D: El TF, factor III, es el receptor primario para el inicio del proceso de coagulación.
9. **A** El factor tisular y el factor VII son exclusivos de la ruta extrínseca. B, C: En la ruta intrínseca, la interacción con la membrana se lleva a cabo con el quininógeno de elevada masa molecular y con la precalicreína.
10. **E** El coágulo se solubiliza mediante la plasmina. A: Tanto la formación como la lisis del coágulo son unidireccionales. B: Tanto el plasminógeno como el t-PA se unen al coágulo. C y D: Ambas se refieren al t-PA.
11. **A** Los bastones son los responsables de la visión con poca luminosidad. C: Los tres pigmentos poseen 11-*cis*-retinal; las proteínas difieren, y son las responsables de los diferentes espectros. D: Se cree que en los conos y los bastones se producen los mismos fenómenos bioquímicos. E: Los conos están mejor preparados para procesos rápidos porque su velocidad de respuesta es aproximadamente cuatro veces más rápida que la de los bastones, aunque su sensibilidad a la luz es mucho menor.
12. **E** Esto provoca el cambio conformacional de la proteína que afecta al potencial de membrana de reposo e inicia el resto de los fenómenos. A: Los conos poseen el mismo grupo prostético pero diferentes proteínas, de modo que la rodopsina sólo se encuentra en los bastones. B: Este es el precursor del grupo prostético 11-*cis*-retinal. C: La isomerización del grupo prostético da lugar a la hiperpolarización. D: La rodopsina es una proteína transmembrana.
13. **C** El Ca^{2+} entra con el Na^{+}. A: Los receptores de acetilcolina se encuentran en la membrana plasmática. B: El impulso da lugar a la despolarización de ambas estructuras. D: Tanto el Ca^{2+} como el Na^{+} entran en el sarcómero cuando se abren los canales. E: La unión de Ca^{2+} a la Tn-C inicia la contracción.
14. **D** Esto se produce por asociación–disociación de actina y miosina. A: La despolarización de los túbulos transversales puede estar involucrada en la transmisión de la señal, pero no directamente en el proceso contráctil. B: Los filamentos no cambian en longitud, si no que se deslizan, unos por delante de los otros. C: Esto no es fisiológico. E: El entrecruzamiento se produce en la banda H de los sarcómeros, pero no cambia durante el proceso contráctil.
15 Las proteinas afectadas son las que poseen residuos de γ-carboxiglutamilo (Gla), que son excelentes quelantes del calcio. La formación de residuos de Gla es una modificación post-traducción catalizada por una carboxilasa, cuyo cofactor esencial es la vitamina K. La warfarina impide la reducción del epóxido de vitamina K formado durante la carboxilación para dar de nuevo la forma dihidroxiquinona, que es necesaria para la reacción.
16 La acetilcolina es un neuritransmisor excitador, que provoca la apertura de los canales, la entrada de Na^{+}, y la despolarización de la membrana. La hidrólisis de la acetilcolina permite la repolarización. La presencia del inhibidor mantiene el canal abierto e impide la repolarización, y por tanto que continúe la transmisión de impulsos nerviosos.



24



METABOLISMO DEL HIERRO Y DEL HEMO

William M. Awad, Jr.

24.1 METABOLISMO DEL HIERRO: VISIÓN GENERAL 1054

24.2 PROTEÍNAS QUE CONTIENEN HIERRO 1054

La transferrina transporta hierro en el suero 1054
La lactoferrina une hierro en la leche 1055
La ferritina es una proteína implicada en el almacenamiento de hierro 1056
Otras proteínas que contienen hierro no hemo intervienen en procesos enzimáticos 1056

24.3 ABSORCIÓN INTESTINAL DEL HIERRO 1057

24.4 REGULACIÓN MOLECULAR DE LA UTILIZACIÓN DEL HIERRO 1059

24.5 DISTRIBUCIÓN Y CINÉTICA DEL HIERRO 1061

24.6 BIOSÍNTESIS DEL HEMO 1063

Los enzimas de la biosíntesis del hemo se encuentran tanto en las mitocondrias como en el citosol 1065
Ácido δ-aminolevulínico sintasa 1065
Aminolevulínico deshidratasa 1068
Porfobilinógeno desaminasa y uroporfirinógeno III sintasa 1069
Uroporfirinógeno descarboxilasa 1070
Coproporfirinógeno oxidasa 1070
Protoporfirinógeno oxidasa 1070
Ferroquelatasa 1070
La ALA sintasa cataliza la etapa limitante de la biosíntesis del hemo 1070

24.7 CATABOLISMO DEL HEMO 1071

La bilirrubina se conjuga en el hígado para formar bilirrubina diglucurónido 1071
La hemólisis intravascular requiere la recuperación del hierro 1074

BIBLIOGRAFÍA 1076

PREGUNTAS 1077

RESPUESTAS 1078

APLICACIONES CLÍNICAS

24.1 Sobrecarga de hierro e infección 1055
24.2 Síntesis de grupos ferro-sulfurados y enfermedades humanas 1057
24.3 Ataxia de Friedreich 1057
24.4 Absorción de hierro en el duodeno 1058
24.5 Mutaciones en los elementos de respuesta al hierro 1060
24.6 Deficiencia de ceruloplasmina 1061
24.7 Anemia ferropénica 1062
24.8 Hemocromatosis Tipo I: genética molecular y la cuestión de las dietas ricas en hierro 1062
24.9 Hemocromatosis Tipo II 1063
24.10 Porfiria intermitente aguda 1066
24.11 Hemólisis isoinmune neonatal 1074
24.12 Deficiencia de bilirrubina-UDP-glucuronosil transferasa 1075
24.13 Aumento de la bilirrubina plasmática conjugada 1075

24.1 METABOLISMO DEL HIERRO: VISIÓN GENERAL

El hierro interviene estrechamente en el metabolismo del oxígeno, permitiendo el transporte y participación del oxígeno en toda una serie de procesos bioquímicos. Los estados de oxidación normales son el ferroso (Fe^{2+}) y el férrico (Fe^{3+}). En ciertos procesos redox se dan intermedios de corta duración con niveles de oxidación más elevados. Por ejemplo, durante la reacción catalizada por el citocromo $P450_{cam}$ (véase el Capítulo 11) de *Pseudomonas putida*, el hierro de uno de los intermedios ha de estar en la forma ferril (Fe^{4+}). El hierro tiene una afinidad hacia átomos electronegativos tales como el oxígeno, nitrógeno y azufre, que proporcionan los electrones que forman enlaces con el hierro. Éstos pueden poseer una afinidad muy elevada cuando están orientados de modo favorable en las macromoléculas. En la formación de complejos ningún electrón de enlace proviene del hierro. Existe una complejidad adicional en la estructura del hierro: los electrones no enlazantes de la capa exterior del metal (los orbitales 3*d* ocupados de manera incompleta) pueden existir en dos estados. Cuando las interacciones de enlace con el hierro son débiles, los electrones exteriores no enlazantes evitan el emparejamiento y se distribuyen por la totalidad de los orbitales 3*d*. Sin embargo, cuando los electrones de enlace interaccionan fuertemente con el hierro, existe un emparejamiento de los electrones no enlazantes exteriores, que favorece a los orbitales 3*d* de energía más baja. Estas dos distribuciones diferentes para cada estado de oxidación del hierro pueden determinarse mediante medidas de resonancia de espín electrónico. La dispersión de los electrones 3*d* a todos los orbitales conduce a un estado de espín elevado, mientras que la restricción de los electrones 3*d* a los orbitales de energía más baja conduce, debido al emparejamiento de electrones, a un estado de espín bajo. Algunos complejos hierro–proteína revelan la existencia de cambios en el estado del espín sin que vayan acompañados de cambios en la oxidación durante el proceso químico (p. ej., fijación y liberación de oxígeno por la hemoglobina).

En los intervalos de pH neutro y alcalino, el potencial redox del hierro en soluciones acuosas favorece el estado Fe^{3+}; a valores de pH ácidos, el equilibrio favorece el estado Fe^{2+}. En el estado Fe^{3+}, el hierro forma lentamente grandes complejos polinucleares con el ion hidróxido, agua y otros aniones que puedan estar presentes. Estos complejos pueden ser tan grandes que llegan a exceder sus productos de solubilidad, lo que conduce a su agregación y precipitación con consecuencias patológicas.

El hierro se puede fijar a una serie de macromoléculas e influir sobre su estructura y función, con resultados perjudiciales para el organismo. Para protegerse contra estas reacciones existen diversas proteínas fijadoras del hierro que funcionan específicamente para almacenarlo y transportarlo. Estas proteínas tienen una gran afinidad por el metal y, en el estado fisiológico normal, también tienen centros de fijación de hierro que no están totalmente ocupados. En algunas proteínas se ha caracterizado bien la interacción del hierro con sus ligandos (p. ej., hemoglobina, mioglobina y transferrina).

24.2 PROTEÍNAS QUE CONTIENEN HIERRO

El hierro se fija a las proteínas bien mediante su incorporación a un anillo de **protoporfirina IX** (véase más adelante), bien mediante interacción con otros ligandos proteicos. Los complejos ferroso- y férrico-protoporfirina IX se han designado, respectivamente, **hemo** y **hematina**. Entre las proteínas que contienen hemo se cuentan las que transportan (p. ej. hemoglobina) y almacenan (p. ej. mioglobina) oxígeno y ciertos enzimas que contienen hemo como parte de sus grupos prostéticos (p. ej., catalasa, peroxidasas, triptófano pirrolasa, prostaglandina sintasa, guanilato ciclasa, NO sintasa, y los citocromos microsómico y mitocondrial). En los Capítulos 9 y 13 se exponen las relaciones estructura–función de las proteínas que contienen hemo.

Entre las proteínas sin hemo se cuentan la transferrina, ferritina y diversos enzimas redox que contienen hierro en el centro activo, así como también las proteínas ferro–sulfuradas. Existe una gran cantidad de información referida a las relaciones estructura–función de algunas de estas moléculas.

La transferrina transporta hierro en el suero

La principal proteína sérica implicada en el transporte de hierro es la **transferrina**, una β1-glucoproteína sintetizada en el hígado, formada por una sola cadena poli-

peptídica de 78 000 Da que contiene dos centros fijadores de hierro no cooperativos. La proteína es un producto de la duplicación génica derivada de un supuesto gen ancestral que codificaba una proteína que sólo fijaba un átomo de hierro. Varios metales se unen a la transferrina, siendo la afinidad más elevada para el Fe^{3+}. La transferrina no fija el Fe^{2+}. La fijación de cada Fe^{3+} depende de modo absoluto de la fijación coordinada de un anión, que en el estado fisiológico es, tal como se indica más adelante, el carbonato.

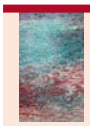
$$\text{transferrina} + Fe^{3+} + CO_3^{2-} \rightarrow \text{transferrina} \cdot Fe^{3+} \cdot CO_3^{2-}$$
$$\text{transferrina} \cdot Fe^{3+} \cdot CO_3^{2-} \rightarrow \text{transferrina} \cdot 2\ (Fe^{3+} \cdot CO_3^{2-})$$

Estimaciones de las constantes de asociación para la fijación del Fe^{3+} a transferrinas de distintas especies las sitúan en el intervalo 10^{19} a 10^{31} M^{-1}, indicando a efectos prácticos que dondequiera que exista un exceso de transferrina no se encontrarán iones férricos libres. En el estado fisiológico normal, aproximadamente una novena parte de las moléculas de transferrina se encuentran saturadas con hierro en ambos centros; cuatro novenas partes de las moléculas de transferrina tienen hierro en uno u otro centro, y cuatro novenos de la transferrina circulante se encuentra libre de hierro. La transferrina no saturada protege frente a las infecciones (véase Apli. Clín. 24.1). Los dos centros de fijación de hierro presentan algunas diferencias en la secuencia y también en su afinidad hacia otros metales. La transferrina se une a receptores específicos de la superficie celular que favorecen en el proceso de internalización de la proteína.

El **receptor de transferrina** es una proteína transmembrana que consiste en dos subunidades de 90 000 Da cada una, unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad contiene un segmento transmembrana y unos 670 residuos extracelulares que pueden unirse a una molécula de transferrina, favoreciendo la forma diférrica. La internalización del complejo transferrina–receptor depende de la fosforilación de este último por un complejo Ca^{2+}–calmodulina–proteína quinasa C. La liberación del hierro se da dentro del medio ácido del lisosoma, tras lo cual el complejo receptor–apotransferrina retorna a la superficie celular y la apotransferrina es liberada para ser reutilizada en el plasma.

La lactoferrina une hierro en la leche

La leche contiene hierro unido casi exclusivamente a una glucoproteína, la **lactoferrina**, homóloga muy próxima de la transferrina, y con dos centros de fijación de metal. El contenido en hierro de la proteína varía, aunque nunca está saturada. Los estudios sobre la función de la lactoferrina se han dirigido hacia su efecto antimicrobiano, que protege al recién nacido contra las infecciones gastrointestinales. Los microorganismos requieren hierro para su replicación y función. La presencia de lactoferrina no totalmente saturada produce la fijación rápida de todo el hierro libre, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano al impedir que entren cantidades suficientes de hierro en los microorganismos. Otros microbios, tales como *Escherichia coli*, que liberan quelantes de hierro competitivos, pueden proliferar a pesar de la presencia de lactoferrina, ya que los quelantes transfieren el hierro de manera específica al microorganismo. La lactoferrina se encuentra en los granulocitos y se libera durante una infección bacteriana. También está presente en las secreciones mucosas. Se cree que, además de tener función bacteriostática, facilita el transporte del hierro y su almacenaje en la leche. Se ha encontrado lactoferrina en la orina de niños prematuros alimentados con leche humana.



APLICACIÓN CLÍNICA 24.1
Sobrecarga de hierro e infección

Si un individuo tiene una sobrecarga de hierro debido a varias causas, el valor de transferrina sérica puede estar cercano a la saturación, haciendo que pequeñas cantidades de hierro libre se encuentren disponibles en el suero. Microorganismos que son normalmente no patogénicos, debido a que son dependientes de hierro y no pueden competir contra la transferrina parcialmente saturada del individuo normal, se pueden convertir en patógenicos en tales circunstancias. Por ejemplo, *Vibrio vulnificus*, un halófilo marino, se encuentra en un pequeño porcentaje de las ostras y del marisco comercial. Los individuos que tienen un exceso de hierro pueden desarrollar una infección que progresa rápidamente, produciéndose la muerte en un intérvalo de 24 h tras la ingestión de estos alimentos, mientras que los individuos normales que consumen la misma comida no presentan absolutamente ningún síntoma.

Muench, K. H. Hemochromatosis and infection: alcohol and iron, oysters and sepsis. *Am. J. Med.* 87:3, 1989.

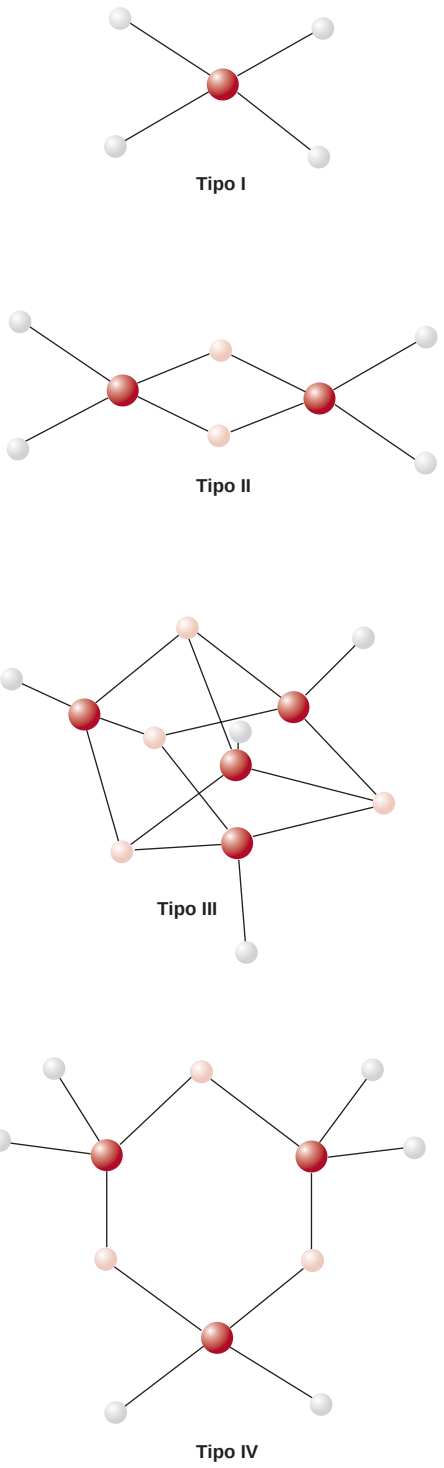


FIGURA 24.1
Estructura de los átomos de hierro y azufre en las ferredoxinas.
Los círculos de color rojo oscuro representan los átomos de hierro; los círculos de color rojo claro representan los átomos de azufre inorgánico; y los círculos pequeños grises representan los átomos de azufre cisteinílicos provenientes de la cadena polipeptídica. Pueden producirse variaciones en las ferredoxinas del tipo IV, en las que uno de los residuos cisteinilo puede ser sustituido por un átomo de oxígeno de un grupo OH del disolvente.

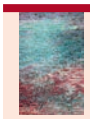
La ferritina es una proteína implicada en el almacenamiento de hierro

La **ferritina** es la proteína principal implicada en el almacenamiento de hierro. La proteína consiste en una capa polipeptídica exterior de 130 Å de diámetro con un núcleo central hidróxido férrico–fosfato de 60 Å de diámetro. La apoproteína, **apoferritina**, está compuesta por 24 subunidades con una combinación variable de cadenas H (178 aminoácidos) y cadenas L (171 aminoácidos), dando lugar a una serie de isoproteínas. Las subunidades H predominan en las células sanguíneas nucleadas y en el corazón, mientras que las subunidades L predominan en el hígado y el bazo. La síntesis de las subunidades está regulada principalmente por la concentración de hierro libre intracelular. La mayor parte del hierro almacenado se presenta en los hepatocitos, las células del retículo endotelial y en el músculo esquelético. La proporción entre hierro y polipéptido no es constante, ya que la proteína tiene la capacidad de incorporar y eliminar hierro según las necesidades fisiológicas. Con una capacidad de 4500 átomos de hierro, la molécula suele contener menos de 3000. Los canales que se originan en la superficie permiten la acumulación y la liberación de hierro. Cuando el hierro se encuentra en exceso, la capacidad de almacenamiento de la apoferritina recién sintetizada puede quedar superada. Esto lleva a la deposición de hierro al lado de las esferas de ferritina. Esta deposición amorfa de hierro se denomina, histológicamente, **hemosiderina**. Las cadenas H de la ferritina oxidan los iones ferrosos al estado férrico. Las ferritinas que provienen de tejidos diferentes de la misma especie presentan diferencias en su movilidad electroforética análogas a las diferencias observadas con los isozimas. En algunos tejidos, las esferas de ferritina forman alineamientos en forma de red fácilmente identificables al microscopio electrónico.

La ferritina plasmática (pobre en hierro y rica en subunidades L) tiene una vida media de 50 h y se elimina a través de las células del retículo endotelial y los hepatocitos. Su concentración, aunque es muy baja, se correlaciona con el tamaño de los almacenes de hierro del organismo.

Otras proteínas que contienen hierro no hemo intervienen en procesos enzimáticos

Muchas ferroproteínas intervienen en procesos enzimáticos, la mayoría de los cuales están relacionados con mecanismos de oxidación. No se conocen bien las características estructurales de los ligandos que fijan el hierro, excepto en el caso de algunos componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Estas últimas proteínas, llamadas **ferredoxinas**, se caracterizan por estar en ellas el hierro unido sólo a átomos de azufre, con una única excepción. Se conocen diversas clases de grupos ferro-sulfurados (véase Figura 24.1). El de menor tamaño, tipo I (p. ej., la nebredoxina), que se encuentra sólo en microorganismos, consta de una cadena polipeptídica pequeña con una masa de aproximadamente 6000 y contiene un átomo de hierro unido a cuatro residuos de cisteína. El tipo II está formado por las ferredoxinas que se encuentran tanto en las plantas como en los tejidos animales, y que contienen dos átomos de hierro, cada uno de los cuales se une a dos residuos de cisteína diferentes, al tiempo que ambos comparten dos aniones sulfuro. Las proteínas ferrosulfuradas más complejas son las ferredoxinas bacterianas de tipo III, que contienen cuatro átomos de hierro, cada uno de los cuales está ligado a un único residuo de cisteína, al tiempo que comparten también tres aniones sulfuro con átomos de hierro vecinos para formar una estructura de tipo cúbico. En algunas bacterias anaeróbicas existe una familia de ferredoxinas que pueden contener dos grupos ferrosulfurados del tipo III por macromolécula. Las ferredoxinas de tipo IV contienen estructuras con tres átomos de hierro, cada uno de ellos unido a dos residuos de cisteína distintos y con dos aniones sulfuro compartidos, que forman un anillo plano. En uno de los ejemplos de este tipo de ferredoxinas se encontró una excepción a que los átomos de hierro están ligados únicamente a átomos de azufre. En este caso, el azufre de un residuo de cisteína estaba sustituido por un átomo de oxígeno del disolvente. El potencial redox que proporcionan las diferentes ferredoxinas varía ampliamente, y depende en parte del entorno de la cadena polipeptídica que envuelve estos grupos ferrosulfurados. En la nebredoxina, el hierro experimenta conversión férrico–ferroso durante el transporte electrónico. En las ferredoxinas vegetales y animales (proteínas ferrosulfuradas tipo II) ambos hierros se encuentran en la forma Fe^{3+} en el estado oxidado; tras su reducción, sólo un hierro pasa al Fe^{2+}. En la ferredoxina bacteriana (proteína ferrosulfurada tipo III) el estado oxidado puede ser $2\ Fe^{3+} \cdot 2\ Fe^{2+}$ ó $3\ Fe^{3+} \cdot Fe^{2+}$, con las correspondientes formas reducidas de $Fe^{3+} \cdot 3\ Fe^{2+}$ ó $2\ Fe^{3+} \cdot 2\ Fe^{2+}$. Re-

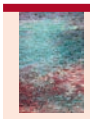


APLICACIÓN CLÍNICA 24.2

Síntesis de grupos ferrosulfurados y enfermedades humanas

Las proteínas ferrosulfuradas se sintetizan en la mitocondria y se exportan al citoplasma, en un proceso que no es bien conocido, en el que intervienen chaperonas mitocondriales y otras proteínas, algunas con una función desconocida hasta ahora. Una mutación en el gen del transportador *ABC7* humano conduce a una forma de anemia sideroblástica ligada al cromosoma X, observada en pacientes con un andar anómalo (ataxia cerebelar) y asociada con el deterioro del desarrollo de proteínas ferro-sulfuradas citosólicas.

Bekri, S., Kispal, G., Lane, H., et al. Human ABC7 transporter gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron–sulfur protein maturation. *Blood* 96:3256, 2000.



APLICACIÓN CLÍNICA 24.3

Ataxia de Friedreich

La frataxina es una proteína mitocondrial de función desconocida, cuya mutación conduce a la enfermedad de la ataxia de Friedrich, asociada con una fuerte reducción en la concentración de esta proteína. La enfermedad se caracteriza por marcadas anomalías en el andar, deterioro del músculo cardíaco, y diabetes. Hay un fuerte incremento de acumulación de hierro mitocondrial. La expansión de un triplete GAA, en algunos casos hasta 1000 veces, en el intrón 1 de la frataxina es la causa de la patología en alrededor del 98% de los casos. En esta enfermedad no se observa anemia.

Delatycki, M. B., Williamson, R. y Forrest, S. M. Friedreich ataxia: an overview: *J. Med. Genet.* 37:1, 2000.

cientemente, se han caracterizado algunos otros grupos ferro-sulfurados más complicados, lo que pone de manifiesto un creciente papel de estos grupos en el mecanismo redox (véanse Aplis. Clíns. 24.2 y 24.3).

24.3 ABSORCIÓN INTESTINAL DEL HIERRO

La elevada afinidad del hierro tanto para macromoléculas específicas como inespecíficas conduce a la ausencia de formación significativa de sales de hierro libres, por lo que este metal no se pierde por las vías de excreción habituales. Por el contrario, la excreción de hierro tiene lugar sólo a través del recambio normal de tejidos que no son reutilizados (epidermis y células de la mucosa gastrointestinal). En el varón adulto sano, la pérdida es de aproximadamente 1 mg/día. En las mujeres premenopáusicas, los acontecimientos fisiológicos normales de la menstruación y del parto aumentan de manera sustancial la pérdida de hierro. Existe una gran variación en esta pérdida, dependiendo de las cantidades de flujo menstrual y la multiplicidad de nacimientos. En los casos extremos de este último tipo, una mujer premenopáusica puede necesitar una cantidad de hierro cuatro o cinco veces superior a la requerida por un varón adulto durante largos espacios de tiempo. La mujer postmenopáusica que no tiene carencia de hierro tiene una necesidad de hierro parecida a la de un varón adulto normal. Naturalmente, los niños y los pacientes con pérdidas de sangre tienen una necesidad de hierro mayor.

La cocción de los alimentos facilita la rotura de los ligandos unidos al hierro, lo que aumenta la disponibilidad de metal en el intestino. El bajo pH del estómago permite la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} facilitando la disociación de los ligandos. Esto requiere la presencia de un reductor, lo que se consigue normalmente añadiendo ascorbato a la dieta. Cuando el estómago no funciona normalmente, se reduce de manera sustancial la cantidad de hierro absorbida. Algunos compuestos que contienen hierro fijan el metal tan fuertemente que no puede asimilarse. Contrariamente a la creencia popular, la espinaca es una fuente pobre de hierro debido a un error previo en la cuantificación del hierro y a que parte del hierro se encuentra unido al fitato (inositol hexafosfato), que es resistente a las acciones químicas del tracto gastrointestinal. Se ha sugerido que existen cofactores específicos formados en el estómago o en el páncreas que facilitan la absorción del hierro en el intestino delgado.

El lugar principal de absorción del hierro es el intestino delgado. La absorción máxima tiene lugar en el duodeno, y en las porciones más distales del intestino del-

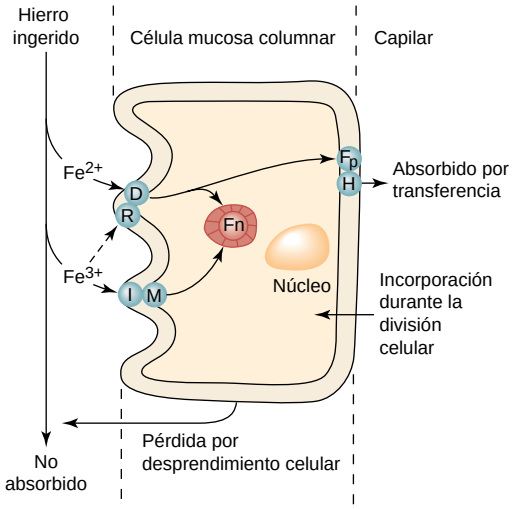
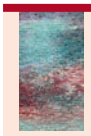


FIGURA 24.2
Regulación de la absorción de hierro a nivel de la mucosa intestinal.
Se indica el flujo del hierro en la célula de la mucosa duodenal. Una fracción del hierro potencialmente aceptable se transfiere desde la luz intestinal a la célula epitelial. Una gran parte del hierro ingerido no se absorbe debido, en parte, a que no se encuentra en una forma fácilmente aceptable. Parte del hierro es retenido dentro de la célula, fijado por la apoferritina que forma ferritina. Este hierro se desprende a la luz intestinal con el recambio normal de la célula. Una parte del hierro de la célula mucosa se absorbe y transfiere al lecho de capilares para incorporarse a la transferrina. Durante la división celular, que tiene lugar en las bases de los pliegues intestinales, se incorpora el hierro para las necesidades celulares. Estos flujos cambian de forma espectacular en los estados de agotamiento o de exceso de hierro. Se indican las siguientes estructuras: D, DMT 1; I, Integrina; M, mobilferrina; Fn, ferritina; Fp ferroportina 1; H, hefestina; y R, ferrirreductasa, que probablemente actúa sobre la DMT 1 (véase Apli. Clín. 24.4).

gado se produce un gradiente hacia una menor absorción. El metal entra en la célula de la mucosa, bien como hierro libre, bien como hemo; en el segundo caso, el metal se separa del anillo de la porfirina en el citoplasma de la mucosa. La gran cantidad de bicarbonato secretado por el páncreas neutraliza el material ácido que proviene del estómago, con lo que se favorece la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+}. Cualesquiera que sean las necesidades del huésped, en presencia de un suministro ade-



APLICACIÓN CLÍNICA 24.4
Absorción de hierro en el duodeno

El hierro se absorbe probablemente en tres formas desde la luz intestinal a la mucosa duodenal: como ion ferroso, como ion férrico, y como hemo. No se conoce el mecanismo de absorción del hemo. El ion ferroso se une a una proteína transmembrana, el transportador de metales divalentes 1 (DMT 1), conocido también como transportador de cationes divalentes 1 (DCT 1) o como proteína de macrófago asociada a la resistencia natural 2 (Nramp 2). La transferencia de hierro depende de un mecanismo acoplado a protones. Esta proteína puede transportar otros metales como el zinc, manganeso, cobalto, cadmio, y plomo. El miembro original de esta familia de proteínas se encontró en los macrófagos y se denomina Nramp 1. Pruebas recientes sugieren que la función de esta última proteína es presentar el hierro al macrófago, permitiendo a la célula llevar a cabo funciones redox importantes para la resistencia del huésped. El gen de la DMT 1 contiene 17 exones. El mRNA puede cortarse y empalmarse de formas diferentes en el extremo 3′, incluyendo diferentes regiones 3′ no traducidas. Una forma contiene un único IRE 3′ lo que indica que es posible el control post-transcripción de la expresión de esta proteína. Se ha descrito una ferrirreductasa en las microvellosidades de la mucosa intestinal que puede estar estrechamente asociada con la DMT 1.

La absorción de hierro férrico puede seguir una ruta diferente. La mucina de la luz duodenal ayuda a la solubilización de iones férricos con presentación del metal a una integrina, proteína transmembrana que consiste en un heterodímero de 230 kDa. La superficie citosólica de la integrina interacciona con una proteína soluble de 56 kDa conocida como mobilferrina. La integrina transfiere el hierro desde la superficie luminal de la célula a la citoplasmática, donde es fijado por una proteína soluble, la mobilferrina, que actúa de lanzadera citoplasmática, transfiriendo el hierro a la ferritina citosólica o bien hacia el polo opuesto de la célula. Una proteína transmembrana denominada ferroportina 1, en la superficie basolateral de la célula de la mucosa, transfiere el hierro desde el citosol a través del endotelio a la transferrina, y actúa por tanto como un exportador de hierro. El mRNA de esta proteína posee un IRE en la región 5′ no traducida. En las células de Kupfer y en los macrófagos se observa también un nivel elevado de expresión de esta proteína. La ferroportina 1 transfiere iones ferrosos. Está estrechamente asociada con una segunda proteína, la hefestina, que es homóloga a la ceruloplasmina; la suposición es que la hefestina actúa como una ferroxidasa, convirtiendo el ion ferroso en la forma férrica y permitiendo su incorporación en la transferrina. Las diferentes localizaciones de los IRE en la DMT 1 y la ferroportina 1 serían aparentemente contraproducentes, ya que se esperaría normalmente que ambas estuvieran reguladas positiva o negativamente de forma concertada. La función aparente de ambas proteínas es controlar la presentación del hierro a la transferrina. Sin embargo, en un estado determinado del hierro, un RNA mensajero estaría estabilizado, mientras que el otro estaría inhibido. Este punto sigue sin resolver. En el estado de carencia de hierro aumenta la concentración de DMT 1. La mobilferrina responde a la carencia de hierro no aumentando su concentración sino yendo del citoplasma a las microvellosidades, estando de esta forma más cercana al lugar de la entrada de hierro.

Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403:776, 2000; Conrad, M. E, Umbreit, J. N., Moore, E. G., et al. Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279:G767,2000; Umbreit, J. M., Conrad, M. E., Simovich, M. J., et. al. Identification and localization of iron transport protein in normal and iron deficient cells. *Blood* 96:227a, abstract #968, 2000; y Riedel, H. D., Remus, A. J., Fitscher, B. A., et al. Characterization and partial purification of a ferrireductase from human duodenal microvillus membranes. *Biochem. J.* 309:745, 1995.

cuado de hierro a la luz, una cantidad sustancial de hierro penetra en la célula de la mucosa. La regulación de la transferencia de hierro tiene lugar entre la célula de la mucosa y el lecho de capilares (véanse Figura 24.2 y Apli. Clín. 24.4). En el estado normal, hay ciertos procesos que definen la cantidad de hierro que será transferida. Cuando hay deficiencia de hierro, la cantidad transferida aumenta; cuando hay un exceso de hierro en el huésped, la cantidad transferida disminuye sustancialmente. Se ha demostrado que un mecanismo que regula esta transferencia de hierro a través de la interfase mucosa–capilares es la síntesis de apoferritina por la célula de la mucosa. Cuando el huésped requiere poco hierro, se sintetiza una gran cantidad de apoferritina para atraparlo dentro de la célula de la mucosa, con lo que se impide la transferencia al lecho de capilares. A medida que se reponen las células (en una semana), sus contenidos se expulsan a la luz intestinal sin que tenga lugar su reabsorción. Cuando existe un déficit de hierro, no se sintetiza, virtualmente, apoferritina, con el fin de que ésta no compita con la transferencia de hierro al huésped deficitario. La Figura 24.2 y la Apli. Clín. 24.4 proporcionan detalles sobre los aspectos moleculares de la absorción del hierro.

24.4 REGULACIÓN MOLECULAR DE LA UTILIZACIÓN DEL HIERRO

En el citosol se encuentran al menos dos proteínas que responden a los cambios en la concentración de hierro. Actúan como moléculas efectoras que controlan la traducción de los mRNA, importantes en el metabolismo del hierro. Estas **proteínas reguladoras de hierro (IRP)** se unen a **estructuras específicas de tallo y lazo** presentes en ciertos mRNA. La mejor caracterizada es la IRP-1. Cuando la concentración celular de hierro es elevada contiene un grupo cubano Fe_4S_4. Este grupo prostético activa la IRP-1, de forma que posea actividad **aconitasa** (véase p. 554). Sin embargo, dado que en el citosol no se encuentra citrato o isocitrato en cantidades significativas, dicha actividad es únicamente potencial. En condiciones de baja concentración de hierro, la estructura cubano se colapsa y se disocia de la proteína, lo que da lugar a un apoenzima sin actividad catalítica. Pero a continuación se puede unir a estructuras específicas de tallo y lazo del mRNA, denominadas **elementos de respuesta al hierro (IRE)** (véase Figura 24.3). Se conocen siete mRNA que codifican proteínas con funciones definidas en el metabolismo del hierro que contienen IRE (véanse los detalles en la Tabla 24.1). Sin embargo, una búsqueda en la base de datos de secuencias humanas, ha revelado alrededor de 70 genes que contienen IRE, lo que subraya el importante papel del hierro en muchos procesos metabólicos aún por identificar. Éste es un campo de conocimiento en rápida expansión. Cinco de estos mRNA poseen una única estructura tallo-lazo en la región 5′; dos mRNA tienen IRE en la región 3′. El receptor de la transferrina tiene cinco estructuras tallo-lazo en la región 3′, mientras que el **transportador de metales divalentes 1** (DMT 1) tiene uno sólo. La unión de los IRE flanqueantes en 5′ y 3′ produce diferentes efectos en la traducción. En un estado de carencia de hierro, la unión del IRE 3′ al receptor de la transferrina (véase Figura 24.4) conlleva la estabilización del mRNA, con un recambio reducido, y por consiguiente, un aumento en el número de moléculas receptor–RNA específico.

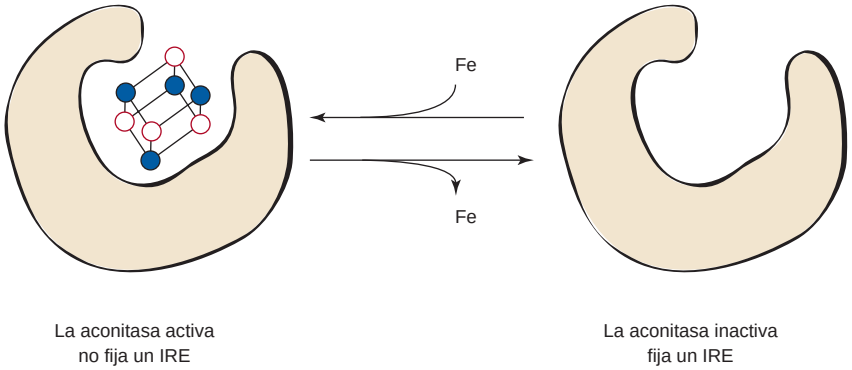
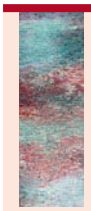


FIGURA 24.3
Proteína 1 de respuesta al hierro.
Los círculos oscuros representan átomos de hierro, y los círculos claros átomos de azufre inorgánico.



APLICACIÓN CLÍNICA 24.5
Mutaciones en los elementos de respuesta al hierro

Se han descrito mutaciones puntuales en el segmento del lazo perteneciente al elemento de respuesta al hierro del mRNA de la cadena ligera de la ferritina, con el resultado de que se incrementa la cantidad de apoferritina sintetizada, sin que incremente el hierro total corporal. Esta mutación conlleva en un caso una disminución de 28 veces en la afinidad para la IRP-1. El contenido en L-ferritina del cristalino puede aumentar nueve veces en comparación con el contenido en el cristalino de individuos control. Como consecuencia de ello, aparecen cristales de cadena ligera de ferritina pura en el cristalino, ocasionando cataratas. El gran aumento en la síntesis de ferritina en el cristalino puede conducir a un aumento de las reacciones catalizadas por hierro, con lesiones oxidativas del cristalino bien conocidas.

Muy recientemente se ha descrito una mutación en una familia japonesa en el IRE del mRNA de la cadena H de la ferritina, con un fuerte aumento de la afinidad para la IRP. La captura de las IRP conduce a una disminución de la síntesis de cadena H y un aumento de la síntesis de la cadena L. Esta patología está asociada a un aumento significativo en el contenido de hierro corporal, pero aparentemente sin pruebas de cataratas.

Girelli, D., Corrocher, R., Bisceglia, L., et al. Molecular basis for the recently described hereditary hyperferritinemia–cataract syndrome: a mutation in the iron-responsive elements of ferritin L-subunit gene (the "Verona mutation"). *Blood* 86:4050, 1995; Beaumont, C., Leneuve, P., Devaux, I., et al. Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nature Genet.* 11:444, 1995; Mumford, A. D., Cree I. A., Arnold, J. D., et al. The lens in hereditary hyperferritinemia cataract syndrome contains crystalline deposits of L-ferritin. *Br. J. Ophthalmol.* 84:697, 2000; y Kato, J., Fujikawa, K., Kanda, M., et al. Mutation in the iron-responsive element of H-ferritin subunit in a family associated with hepatic siderosis. *Blood* 96:484a, abstract #2081, 2000.

TABLA 24.1 mRNA que contienen IRE

mRNA	*Posición*	*Número*	*Compartimiento*
L-ferritina	5′	Único	Citosol
H-ferritina	5′	Único	Citosol
ALA sintasa de eritrocito	5′	Único	Mitocondria
Aconitasa mitocondrial	5′	Único	Mitocondria
Ferroportina 1	5′	Único	Citosol
Receptor de transferrina	3′	Múltiple	Citosol
Transportador de metales divalentes 1	3′	Único	Citosol

Esto aumenta la síntesis de proteína receptora. La única región tallo-lazo 5′ del mRNA de la ferritina (véase Figura 24.5) es homóloga a las estructuras presentes en posición 3′ del mRNA del receptor para la transferrina. En el primer caso, sin embargo, la unión de la IRP conlleva una disminución en la velocidad de traducción del mRNA, y por consiguiente, una menor concentración de moléculas de ferritina. Obsérvese que los fenómenos moleculares sujetos a regulación son distintos para la síntesis del receptor de la transferrina y para la apoferritina (véase Apli. Clín. 24.5).

En resumen, las concentraciones bajas de hierro conllevan la activación de una IRP que se une a los mRNA del receptor de la transferrina y de la ferritina. En el primer caso se sintetiza más receptor, mientras que en el segundo se sintetiza menos apoferritina. El efecto neto de ello es la utilización del hierro por las células en proliferación. Por el contrario, concentraciones altas de hierro conducen a la pérdida de la unión de las IRP a los IRE, pasando de una captación del hierro por las células en proliferación a un almacenamiento en el hígado.

La IRP-1 está regulada por su propio cambio entre los estados activo a inactivo respecto a la unión al mRNA, tal como se ha mencionado anteriormente. La **IRP-2**, una segunda proteína reguladora, también responde a las variaciones en la concentración de hierro, pero en este caso, la regulación se produce mediante un incremento de la síntesis a bajas concentraciones de hierro y un aumento de su degradación en los proteasomas cuando la cantidad de hierro es elevada. Además de los efectos de las variaciones en la concentración de hierro, un aumento en la producción de NO (véase p. 486) también regula las IRP. Puede tener lugar una activación adicional por fosforilación.

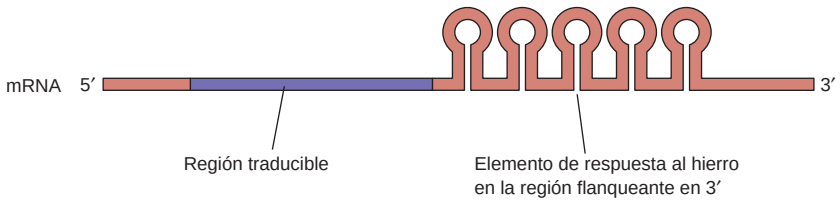


FIGURA 24.4
Estructura del mRNA del receptor de la transferrina.

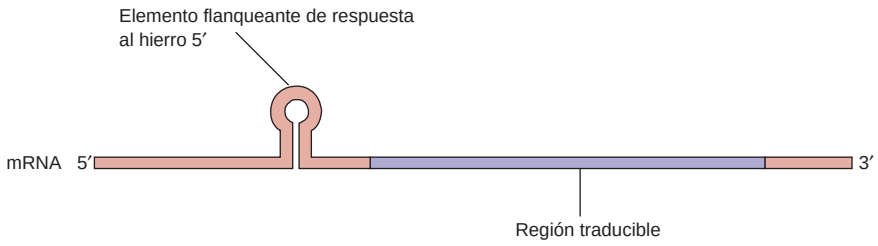


FIGURA 24.5
Estructura del mRNA de la subunidad H de la apoferritina.

24.5 DISTRIBUCIÓN Y CINÉTICA DEL HIERRO

Un varón normal de 70 kg tiene 3–4 g de hierro de los que sólo 0,1% (3,5 mg) se encuentran en el plasma. Aproximadamente 2,5 g están en la hemoglobina. La Tabla 24.2 indica la distribución del hierro en el hombre. Normalmente, alrededor del 33% de los centros de la transferrina contienen hierro. El hierro captado del intestino se transporta principalmente a la médula ósea para su incorporación a la hemoglobina de los eritrocitos. La movilización del hierro desde la mucosa intestinal y los centros de almacenamiento implica, en parte, la reducción del hierro al estado ferroso y su reoxidación a la forma férrica. No se han podido determinar adecuadamente los mecanismos de reducción. Por otro lado, la reconversión del ion Fe^{2+} a Fe^{3+} está regulada por enzimas séricos denominados ferroxidasas, tal como se indica:

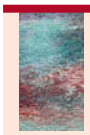
$$Fe^{2+} + \text{ferroxidasa} \rightarrow Fe^{3+} + \text{ferroxidasa reducida}$$

La **ferroxidasa I** también se conoce como **ceruloplasmina** (véase Apli. Clín. 24.6). Otra proteína sérica, la **ferroxidasa II**, parece ser el principal componente sérico que oxida los iones ferrosos. En cualquier proceso patológico en el que las pérdidas de hierro superen su reposición, se produce una secuencia de respuestas fisiológicas. Los acontecimientos iniciales no producen síntoma alguno en el sujeto e implican la reducción de los depósitos de hierro, sin que ello comprometa ninguna función fisiológica. Esta reducción se manifiesta en una disminución o ausencia de los depósitos de hierro en el hígado y en la médula ósea, y también en un descenso del contenido de la pequeñísima cantidad de ferritina que normalmente está presente en el plasma. Los niveles de ferritina sérica reflejan la liberación lenta desde los sitios de depósito durante el recambio celular normal que tiene lugar en el hígado; las medidas se hacen mediante radioinmunoensayo. La ferritina sérica se encuentra mayoritariamente como apoferritina conteniendo muy poco hierro. Durante esta fase temprana, el nivel y porcentaje de saturación de la transferrina sérica no son claramente anormales. A medida que progresa la deficiencia de hierro, el nivel de hemoglobina empieza a bajar, y aparecen cambios morfológicos en los hematíes. Al mismo tiempo, el hierro sérico desciende a la vez que se produce un incremento de la transferrina sérica total, reflejando esto último una adaptación fisiológica en un intento de absorber más hierro del tracto gastrointestinal. En este estado de merma del hierro, un índice muy sensible lo constituye el porcentaje de saturación con hierro de la transferrina sérica (intervalo normal 21–50%). En este punto, el paciente solicita habitualmente atención médica y se establece el diagnóstico de deficiencia de hierro. En países en los que la deficiencia de hierro es grave, sin que existan medidas médicas correctoras a disposición, puede producirse una tercera y grave fase de la deficiencia de hierro. Empieza a producirse una reducción de los ferroenzimas, lo que conduce a efectos metabólicos muy pronunciados (véase Apli. Clín. 24.7).

En algunos pacientes puede producirse un exceso de hierro, pudiendo el contenido de éste elevarse hasta valores de unos 100 g. Ello es debido a diversas razones.

TABLA 24.2 Distribución aproximada del hierro: Hombre de 70 kg

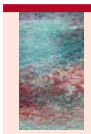
	g	*%*
Hemoglobina	2,5	68
Mioglobina	0,15	4
Transferrina	0,003	0,1
Ferritina, tejido	1,0	27
Ferritina, suero	0,0001	0,004
Enzimas	0,02	0,6
Total	3,7	100



APLICACIÓN CLÍNICA 24.6
Deficiencia de ceruloplasmina

Una deficiencia de ceruloplasmina, proteína que contiene cobre, pero no su ausencia, ha sido asociada con la enfermedad de Wilson que se caracteriza por insuficiencia hepática progresiva y degeneración de los ganglios basales, asociada con una característica deposición de cobre en la córnea (anillos de Kayser–Fleischer). Se pensó inicialmente que la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina no revestía importancia fisiológica, ya que no existían pruebas acerca de un mal funcionamiento en la movilización del hierro en la enfermedad de Wilson. Sin embargo, un defecto genético muy poco frecuente de reciente descubrimiento, que afecta a la biosíntesis de ceruloplasmina, y en el que la proteína está prácticamente ausente en el suero, conlleva un aumento significativo del nivel de hierro hepático y de ferritina sérica. Estos pacientes desarrollan diabetes mellitus, degeneración de la retina y fallos del sistema nervioso central. La diabetes y los fallos en el sistema nervioso central están asociados con aumentos de hierro en el páncreas y en el cerebro respectivamente. En estados de deficiencia de hierro, la transcripción del gen de la ceruloplasmina aumenta cuatro veces. Por tanto, y en contraste con consideraciones previas, parece que la ceruloplasmina juega un papel significativo en el metabolismo del hierro.

Harris, E. D. The iron–copper connection: the link to ceruloplasmin grows stronger. *Nutr. Rev.* 53:226, 1995; Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B. y Fox, P. L. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J. Biol. Chem.* 275:21048, 2000; y Van Eden, M. E. y Aust, S. D. Intact human ceruloplasmin is required for the incorporation of iron into human ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* 381:119, 2000.



APLICACIÓN CLÍNICA 24.7
Anemia ferropénica

El examen al microscopio de un frotis de sangre procedente de un paciente con anemia ferropénica revela normalmente el hallazgo característico de eritrocitos microcíticos (de tamaño pequeño) e hipocrómicos (subpigmentados). Estos cambios en los eritrocitos son el resultado de la disminución de la velocidad en la síntesis de la globina cuando no existe hemo disponible. Una aspiración de la médula ósea revela que no hay depósito de hierro y los valores de ferritina sérica son prácticamente nulos. El valor de la transferrina sérica (expresado como la capacidad total de fijación de hierro) aumenta (límite superior de la normalidad: 410 μgdL^{-1}) con una saturación de hierro sérico inferior al 16%. Entre las causas comunes de la deficiencia de hierro se incluyen flujo menstrual excesivo, partos múltiples y hemorragia gastrointestinal que puede estar enmascarada. Entre las causas comunes de hemorragia gastrointestinal se cuenta la medicación que puede producir úlceras o erosiones de la mucosa gástrica (especialmente aspirina o fármacos tipo cortisona), hernia de hiato, úlcera péptica, gastritis asociada con alcoholismo crónico y tumores gastrointestinales. El tratamiento de estos pacientes ha de incluir un examen cuidadoso de la causa y fuente de la hemorragia y el suplemento de hierro. Este último se proporciona habitualmente en forma de comprimidos orales de sulfato ferroso; en algunos casos puede necesitarse la terapia intravenosa con hierro. Cuando la deficiencia de hierro es grave, puede ser indicada la transfusión con hematíes concentrados. La debilidad y la fatiga asociada con la deficiencia de hierro puede ser debida a la inhibición de la traducción del mRNA de la aconitasa mitocondrial a través de la unión de la IRP a su IRE.

Hentze, M. W. y Kuhn, L. C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA based circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8175, 1996; y Eisenstein, R. S. y Blemings, K. P. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J. Nutr.* 128:2295, 1998.

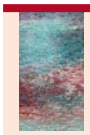
Algunos pacientes tienen una enfermedad congénita recesiva asociada a un marcado e inadecuado incremento de la absorción de hierro. En tales casos, la transferrina sérica puede estar casi completamente saturada con hierro. Este estado, que se conoce como **hemocromatosis idiopática** se observa más frecuentemente en los hombres, ya que las mujeres con el gen anormal están algo protegidas por las situaciones mens-

APLICACIÓN CLÍNICA 24.8
Hemocromatosis Tipo I: genética molecular y la cuestión de las dietas ricas en hierro

El gen de la hemocromatosis es heterocigótico en cerca de un 9% de la población de los EEUU. La enfermedad se expresa principalmente en estado homocigótico; cerca de un 0,25% de los individuos forman el grupo de riesgo. Los individuos normales tienen un gen del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1 (*HFE*) que codifica la cadena α, y que contiene tres dominios de tipo inmunoglobulina. La cadena β asociada es la microglobulina β_2. La estructura del producto génico normal no puede presentar un antígeno. La mayoría de los individuos con hemocromatosis son homocigóticos para una mutación Cys 282 → Tyr que impide la conformación normal de un dominio de tipo inmunoglobulina. Otros individuos pueden tener una mutación Cys 282 → Tyr única en un alelo y una segunda mutación en una posición diferente en el otro alelo. La HFE normal forma un complejo con el dímero del receptor de transferrina para formar un heterotetrámero que contiene dos monómeros del receptor y dos HFE. Estudios de estructura-función han demostrado que los sitios de unión de la transferrina y de HFE se solapan sobre el receptor, sugiriendo que esta unión de HFE sirve para controlar la velocidad de transferencia de hierro a células específicas. Cuando hay una mutación en la HFE que impide la unión al receptor, la transferrina se une en mayor grado, provocando un aumento de los depósitos de hierro en determinadas células. Sin embargo, ésta es una historia incompleta. Todavía no se ha explicado por qué hay un aumento tal de la absorción de hierro en la mucosa intestinal en esta enfermedad.

Durante muchos años ha existido una controversia sobre si, debido a la abundancia de la anemia ferropénica, los alimentos debían reforzarse con hierro, especialmente entre mujeres premenopáusicas. Se sugirió que, si se incorporaban al menos 50 mg de hierro por libra (454 g) de harina enriquecida, se reduciría notablemente la anemia ferropénica. Otros sugerían que el riesgo de que el refuerzo con hierro causara toxicidad debida a un exceso de absorción de hierro era demasiado grande. Suecia ha impuesto el refuerzo con hierro durante 50 años, y aproximadamente el 42% de la ingestión diaria media de hierro proviene de estas fuentes. Sin embargo, en un estudio, un 5% de los hombres presentaban persistencia de niveles elevados de hierro sérico, y un 2% mostraba un aumento en los depósitos de hierro en concordancia con la distribución constatada en las primeras etapas de la hemocromatosis. Este estudio apunta los peligros de dietas suplementadas con hierro. En cambio, en países en los que la deficiencia de hierro está extendida, el refuerzo puede seguir siendo la medida más adecuada.

McLaren, C. E., Gorddeuk, V. R., Looker, A. C., et al. Prevalence of heterozygotes for hemochromatosis in the white population of the United States. *Blood* 86:2021, 1995; Feder, J. N., Gnirki, A., Thomas, W., et al. A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genet.* 13:399, 1996; Olsson, K. S., Heedman, P. A. y Staugard, F. Preclinical hemochromatosis in a population on a high-iron-fortified diet. *J. Am. Med. Assoc.* 239:1999, 1978; Olsson, K. S., Marsell, R., Ritter, B., Olander, B., et al. Iron deficiency and iron overload in Swedish male adolescents. *J. Intern. Med.* 237:187, 1995; Bennett, M. J., Lebron, J. A. y Bjorkman, P. J. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 403:46, 2000; y Steinberg, K. K., Cogswell, M. E., Chang, J. C., et al. Prevalence of C282Y and H63D Mutations in the Hemochromatosis (HFE) Gene in the United States. *J. Am. Med. Assoc.* 283:2216, 2001.



APLICACIÓN CLÍNICA 24.9
Hemocromatosis Tipo II

Existen otras causas para el aumento patológico de la acumulación de hierro, la mayoría de las cuales están por caracterizar. Recientemente, se ha caracterizado una proteína homóloga al receptor de la transferrina y se ha asociado con la absorción de hierro en la mucosa. Se ha observado que mutaciones en esta proteína receptora de transferrina 2 están asociadas con hemocromatosis, a pesar de que los genes HFE son normales. Este receptor, en contraste con el receptor de transferrina 1, no tiene un tallo-lazo en su mRNA ni se une a HFE.

West, A. P. Jr., Bennett, M. J., Sellers, V. M. D., et al. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J. Biol. Chem.* 275:38135, 2000; Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., et al. The gene *TRF 2* is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to *7q22. Nat. Genet.* 25:14, 2000; y Kawabati, H., Yang, R., Hirawa, T., et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* 274: 20826, 1999.

truales y de embarazo. La acumulación de hierro en el hígado, páncreas y corazón puede conducir, respectivamente, a cirrosis y tumores hepáticos, diabetes mellitus e insuficiencia cardíaca. El tratamiento para estos pacientes consiste en extracciones periódicas de grandes cantidades de sangre, cuya hemoglobina es la que contiene el hierro. Otro grupo de pacientes sufren anemias graves, entre las que las más frecuentes son las talasemias, que son un grupo de **anemias hemolíticas** congénitas. En estos casos, los pacientes requieren transfusiones durante toda su vida, lo que provoca la acumulación de grandes cantidades de hierro proveniente de la sangre transfundida. Es evidente que en estos casos la extracción de sangre sería una medida inadecuada; en su lugar, los pacientes se tratan con quelantes de hierro tales como la desferrioxamina, que da lugar a la excreción por la orina de grandes cantidades de hierro complejado. En raras ocasiones, existe un tercer grupo de pacientes que adquieren un exceso de hierro al ingerir grandes cantidades tanto de hierro como de etanol, siendo el segundo un promotor de la absorción de hierro. En estos casos, el hierro almacenado en exceso puede eliminarse mediante sangría (véanse Aplis. Clíns. 24.8 y 24.9).

24.6 BIOSÍNTESIS DEL HEMO

El hemo se sintetiza prácticamente en todos los tejidos de mamíferos. Su síntesis es más pronunciada en la médula ósea y en el hígado debido a las necesidades de incorporación en la hemoglobina y en los citocromos, respectivamente. Tal como se representa en la Figura 24.6, el hemo es fundamentalmente una molécula plana. Consta de un ion de hierro ferroso y un anillo tetrapirrólico, la **protoporfirina IX**. El diámetro del átomo de hierro es un poco demasiado grande para ser acomodado dentro del plano del anillo de porfirina, por lo que sale hacia fuera por un lado, coordinándose con los nitrógenos apicales de los cuatro grupos pirrólicos. El hemo es uno de los compuestos más estables, lo que refleja sus marcadas características de resonancia.

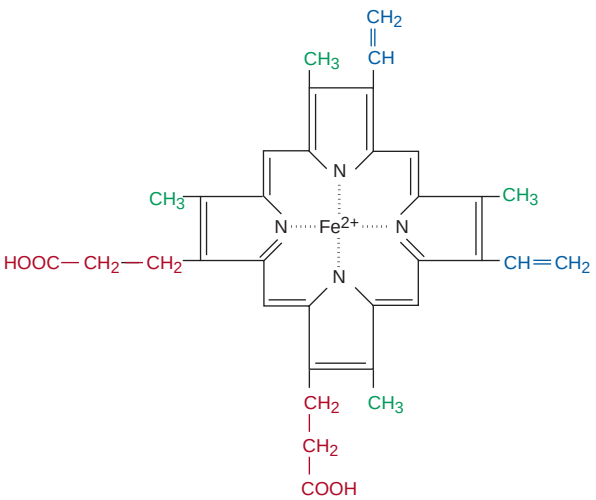


FIGURA 24.6
Estructura del hemo.

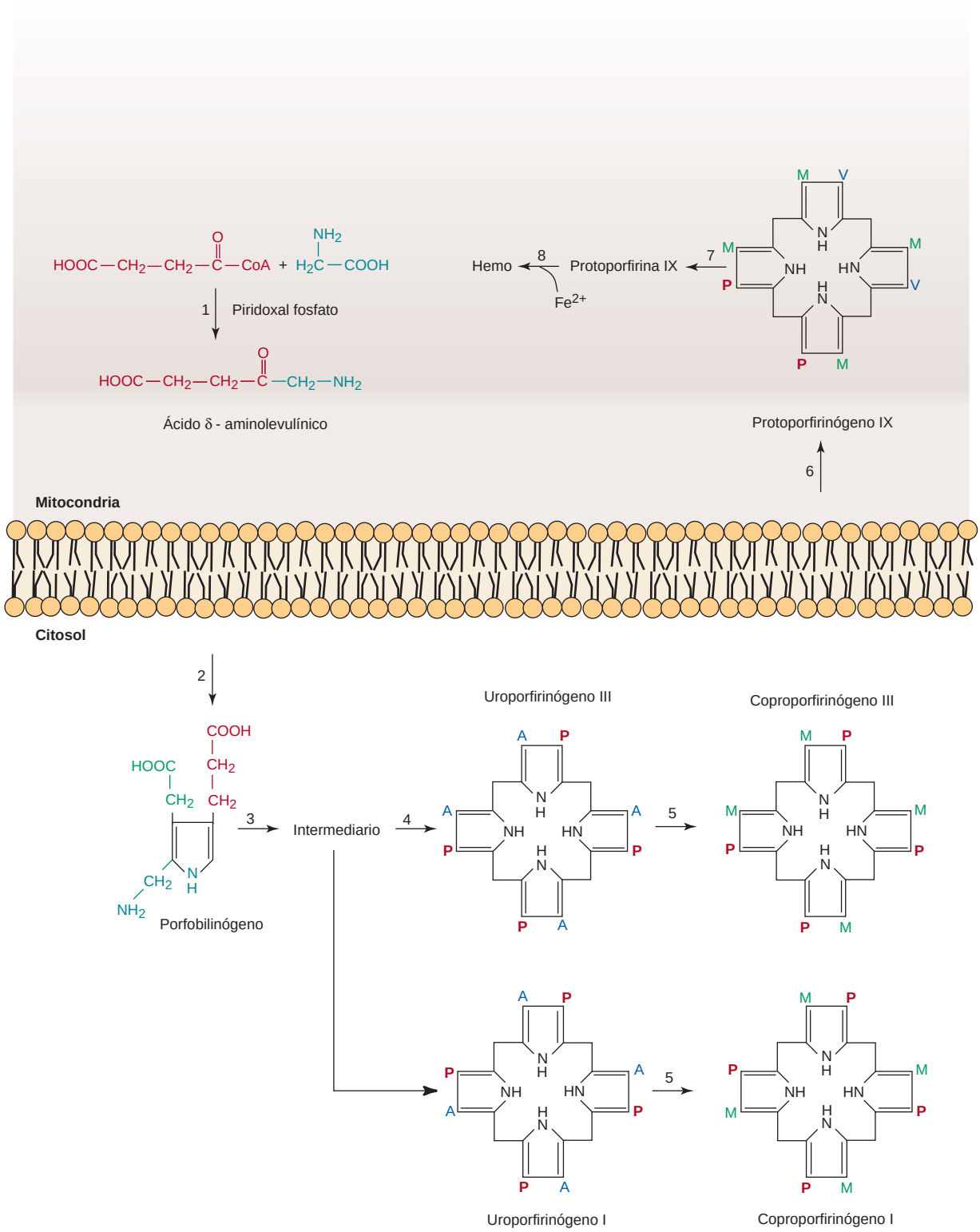


FIGURA 24.7
Ruta de biosíntesis del hemo.
Los números indican los enzimas que intervienen en cada uno de los pasos según el código siguiente: 1, ALA sintasa; 2, ALA deshidratasa: 3, porfobilinógeno desaminasa; 4, uroporfirinógeno III cosintasa; 5, uroporfirinógeno descarboxilasa; 6, coproporfirinógeno III oxidasa; 7, protoporfirinógeno IX oxidasa; 8, ferroquelatasa. Los ligandos pirrólicos se indican según las abreviaturas siguientes: P, propiónico; A, acético; M, metilo; V, vinilo.

La Figura 24.7 describe la ruta de la biosíntesis del hemo. Los aspectos importantes que han de tenerse en cuenta son los siguientes: primero, el paso enzimático inicial, así como los tres últimos, están catalizados por enzimas que se encuentran en la mitocondria, mientras que los pasos intermedios tienen lugar en el citosol. Esto es importante al considerar la regulación por el hemo de su primer paso biosinté-

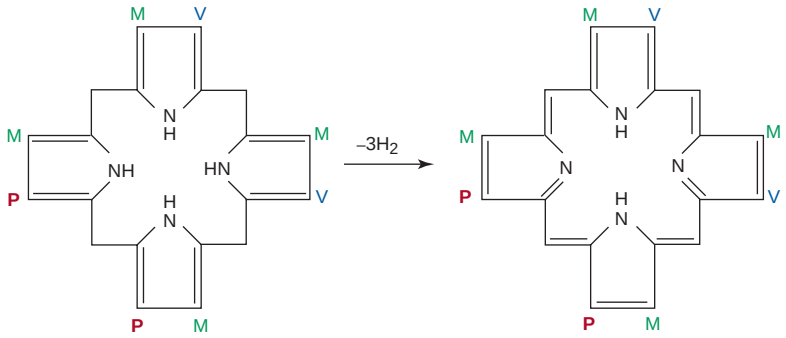
tico; este punto se trata más adelante. Segundo, la porción orgánica del hemo proviene en su totalidad de ocho residuos de glicina y succinil CoA. Tercero, las reacciones que tienen lugar sobre los grupos laterales unidos al anillo tetrapirrólico implican a intermediarios incoloros conocidos como **porfirinógenos**. Estos compuestos, si bien muestran características de resonancia dentro de cada anillo pirrólico, no muestran resonancia entre los grupos pirrólicos. En consecuencia, los porfirinógenos son inestables y se pueden oxidar fácilmente, especialmente en presencia de luz, por medios no enzimáticos, dando sus productos de **porfirina** estables. En estos últimos casos, la resonancia entre los grupos pirrólicos se establece por oxidación de los cuatro puentes metileno. La Figura 24.8 muestra la conversión enzimática del protoporfirinógeno en protoporfirina mediante este mecanismo de oxidación. Ésta es la única oxidación de porfirinógeno conocida en el ser humano que está regulada enzimáticamente; las restantes conversiones de porfirinógeno a porfirina no son enzimáticas, y están catalizadas por la luz en lugar de por enzimas específicos. Cuarto, una vez formado el anillo tetrapirrólico, el orden de los grupos R alrededor del anillo tetrapirrólico en el sentido de las agujas del reloj define cuál de los cuatro tipos posibles de **uro-** o **coproporfirinógeno** se está sintetizando. Estos últimos compuestos tienen dos sustituyentes diferentes, y cada grupo pirrólico contiene uno de cada tipo. Desplazándose en la dirección de las agujas del reloj alrededor del anillo, los sustituyentes se pueden ordenar ABABABAB (en donde A y B son sustituyentes diferentes), formando un porfirinógeno tipo I, o bien el ordenamiento puede ser ABABABBA, formando un porfirinógeno tipo III. En principio, pueden darse otros dos ordenamientos para formar los porfirinógenos II y IV sintetizables químicamente; sin embargo, éstos no se dan en la naturaleza. En el protoporfirinógeno y en la protoporfirina existen tres tipos de sustituyentes, por lo que la clasificación es más complicada; el tipo IX es la única forma que se sintetiza en la naturaleza.

Los trastornos del metabolismo de las porfirinas se conocen clínicamente como **porfirias**. Esta familia de enfermedades es de gran interés, ya que ha demostrado lo complicada que es la regulación de la biosíntesis del hemo. Las manifestaciones clínicas de las distintas porfirias proporcionan una exposición fascinante de anormalidades de la regulación bioquímica y su relación con los procesos fisiopatológicos. En la Tabla 24.3 se dan los detalles de las diferentes porfirias (véase Apli. Clín. 24.10).

Los enzimas de la biosíntesis del hemo se encuentran tanto en las mitocondrias como en el citosol

Ácido δ-aminolevulínico sintasa

La **ácido δ-aminolevulínico (ALA) sintasa** controla el paso limitante de velocidad de la síntesis del hemo en todos los tejidos estudiados. La síntesis del enzima tiene lugar en el citosol y está dirigida por mRNA procedente del núcleo. El enzima se incorpora a la matriz mitocondrial. El succinil CoA, un intermedio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, es uno de los sustratos y sólo se encuentran en la mitocondria. Se ha purificado esta proteína hasta la homogeneidad a partir de mitocondrias

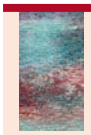


Protoporfirinógeno IX **Protoporfirina IX**

FIGURA 24.8
La acción de la protoporfirinógeno IX oxidasa es un ejemplo de la conversión de un porfirinógeno en una porfirina.

TABLA 24.3 Alteraciones en el metabolismo de la porfirina

Enfermedad	*Genética*	*Tejido*	*Enzima*	*Actividad*	*Órganos patológicos*
Porfiria intermitente aguda	Dominante	Hígado	1. ALA sintasa 2. Porfobilinógeno desaminasa 3. Δ-5α-reductasa	Aumento Disminución Disminución	Sistema nervioso
Coproporfiria hereditaria	Dominante	Hígado	1. ALA sintasa 2. Coporporfirinógeno oxidasa	Aumento Disminución	Sistema nervioso; piel
Porfiria jaspeada	Dominante	Hígado	1. ALA sintasa 2. Protoporfirinógeno oxidasa	Aumento Disminución	Sistema nervioso; piel
Porfiria cutánea tardía	Dominante	Hígado	1. Uroporfirinógeno descarboxilasa	Disminución	Piel, inducida por enfermedad hepática
Protoporfiria hereditaria	Dominante	Médula	1. Ferroquelatasa	Disminución	Cálculos biliares, enfermedad hepática, piel
Porfiria eritropoyética	Recesiva	Médula	1. Uroporfirinógeno III cosintasa	Disminución	Piel y apéndices, sistema retículo endotelial
Envenenamiento por plomo	Ninguna	Todos los tejidos	1. ALA deshidratasa 2. Ferroquelatasa	Disminución Disminución	Sistema nervioso sangre; otros



APLICACIÓN CLÍNICA 24.10
Porfiria intermitente aguda

Una mujer de 40 años aparece en urgencias en un estado de agitación, llorando y quejándose de dolor abdominal agudo. Indica que ha estado estreñida durante varios días y que ha notado una sensación de debilidad en sus brazos y piernas, y dice que "no parece que las cosas estén bien del todo". El examen físico revela un ritmo cardíaco ligeramente rápido (100/min) y también hipertensión moderada (presión sanguínea de 160/110 mmHg). Ha pasado por episodios anteriores de dolor abdominal agudo; en dos ocasiones se realizaron exploraciones abdominales que no pusieron de manifiesto ninguna anormalidad. Los resultados de las pruebas de laboratorio habituales se hallan dentro de la normalidad. Ninguna de las quejas de tipo neurológico parece tener un foco anatómico localizado. Se decide que los síntomas actuales son en gran parte de origen psiquiátrico, obedeciendo a una base funcional más que orgánica. Se seda a la paciente con 60 mg de fenobarbital; un psiquiatra accede a examinar a la paciente en el término de 4 horas. El personal de la sala de urgencias observa un deterioro notable en el estado de la paciente; aparece rápidamente una debilidad generalizada que progresa poniendo en peligro la función respiratoria. Este desarrollo amenazador lleva a la incorporación inmediata al régimen de respiración asistida, con transferencia de la paciente a la unidad de cuidados intensivos para un control fisiológico. El estado de la paciente continúa deteriorándose y muere al cabo de 48 horas. Se descubre más tarde que una muestra de orina de la paciente contiene un nivel de porfobilinógeno notablemente elevado. Esta paciente sufría porfiria intermitente aguda, una enfermedad con trastornos de la biosíntesis del hemo que se conoce de modo muy incompleto. Existe un patrón de herencia dominante asociado a una producción excesiva de los precursores de la porfirina, ALA y porfobilinógeno. En los casos estudiados cuidadosamente, se han observado tres anormalidades enzimáticas. Entre ellas se cuentan (1) un marcado incremento de la ALA sintasa, (2) una reducción a la mitad de la actividad de la porfobilinógeno desaminasa y (3) una reducción a la mitad de la actividad de la esteroide Δ^4-5α-reductasa. La variación en contenido del segundo enzima está en consonancia con una expresión dominante. El cambio en el contenido del tercer enzima es adquirido y, aparentemente, no es una expresión congénita de la enfermedad. Se cree que la disminución de porfobilinógeno desaminasa conduce a un descenso poco importante de hemo en el hígado. La baja concentración de hemo conduce a la imposibilidad de reprimir la síntesis e inhibir la actividad de la ALA sintasa. Dado que esta enfermedad casi nunca se manifiesta antes de la pubertad, se cree que la inducción de Δ^4-5β-reductasa en la adolescencia pone de manifiesto la enfermedad. Debido a que estos pacientes no tienen una cantidad suficiente de Δ^4-5α-reductasa, se considera que el aumento de esteroides 5β se debe a una desviación de los esteroides Δ^4 hacia la ruta de la 5β-reductasa. Existen controversias acerca de la importancia de las anormalidades en esta ruta metabólica sobre la patogénesis de la porfiria.

Desde el punto de vista fisiopatológico, la enfermedad supone un gran enigma; los trastornos del metabolismo porfirínico están confinados en el hígado, que, anatómicamente, aparece normal, mientras que los hallazgos patológicos están restringidos al sistema nervioso. En el caso presente, la implicación de (1) el cerebro, llevó a un estado agitado y confuso y al colapso respiratorio, (2) el sistema autónomo produjo la hipertensión, el incremento del ritmo cardíaco y el estreñimiento con dolor abdominal, y (3) el sistema nervioso periférico y la médula espinal produjeron la debilidad y los trastornos sensoriales. Ningún intermediario conocido de la biosíntesis del hemo puede causar experimentalmente la patología observada en la porfiria intermitente aguda. Debería haber existido una mayor sospecha de la posibilidad de porfiria al inicio de la presentación de la paciente. El análisis de porfobilinógeno en la orina es una prueba relativamente sencilla. El tratamiento habría consistido en la infusión de glucosa, la exclusión de cualquier fármaco que pudiese causar la elevación de la ALA sintasa (p. ej., barbituratos), y si no respondiese satisfactoriamente a pesar de estas medidas, la administración de hematina intravenosa para inhibir la actividad y síntesis de la ALA sintasa. La porfiria intermitente aguda tiene un interés histórico y político. La enfermedad se diagnosticó a dos descendientes del rey Jorge III, sugiriendo ello que la personalidad trastornada de este último antes y durante la Revolución Americana podría adscribirse a esta enfermedad.

Meyer, U. A., Strand, L. J., Dos, M., et al. Intermittent acute porphyria: demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism. *N. Engl. J. Med.* 286:1277, 1972; y Stein, J. A. y Tschudy, D. D. Acute intermittent porphyria: a clinical and biochemical study of 46 patients. *Medicine* (*Baltimore*) 49:1, 1970.

de hígado de rata. El enzima citosólico consiste en un homodímero con subunidades de 71 000 Da cada una, que contiene una secuencia señal N-terminal básica que dirige el enzima hacia la mitocondria. Un componente citosólico dependiente de ATP, de 70 000 Da, conocido como chaperona, mantiene la ALA sintasa en estado desplegado extendido; ésta es la única forma del enzima que puede pasar a través de la membrana mitocondrial. A continuación, la secuencia señal N-terminal es eliminada en la matriz mitocondrial por una proteasa dependiente de metal, lo que da lugar a una ALA sintasa formada por subunidades de 65 000 Da. En el interior de la matriz se produce el correcto plegamiento de la proteína a través de un segundo proceso dependiente de ATP, catalizado por una proteína chaperona oligomérica constituida por 14 subunidades de 60 000 Da cada una (véase Figura 24.9). La ALA sintasa tiene una vida biológica media corta, de unos 60 min. Tanto la síntesis como la actividad del enzima están sujetas a regulación por un gran número de sustancias. En presencia de hemina 5 mM, tiene lugar un 50% de inhibición de la actividad, y la inhibición es prácticamente completa a una concentración 20 mM. La reacción enzimática implica la condensación de un residuo de **glicina** con uno de **succinil CoA** para producir el ácido **δ**-aminolevulínico. La reacción tiene una necesidad absoluta de **piridoxal fosfato**. Existen dos isozimas para la ALA sintasa; sólo el mRNA de la forma eritrocitaria contiene un IRE. Mutaciones en la forma eritrocitaria producen un segundo tipo de anemia sideroblástica ligada al cromosoma X. En este caso no se observa ataxia.

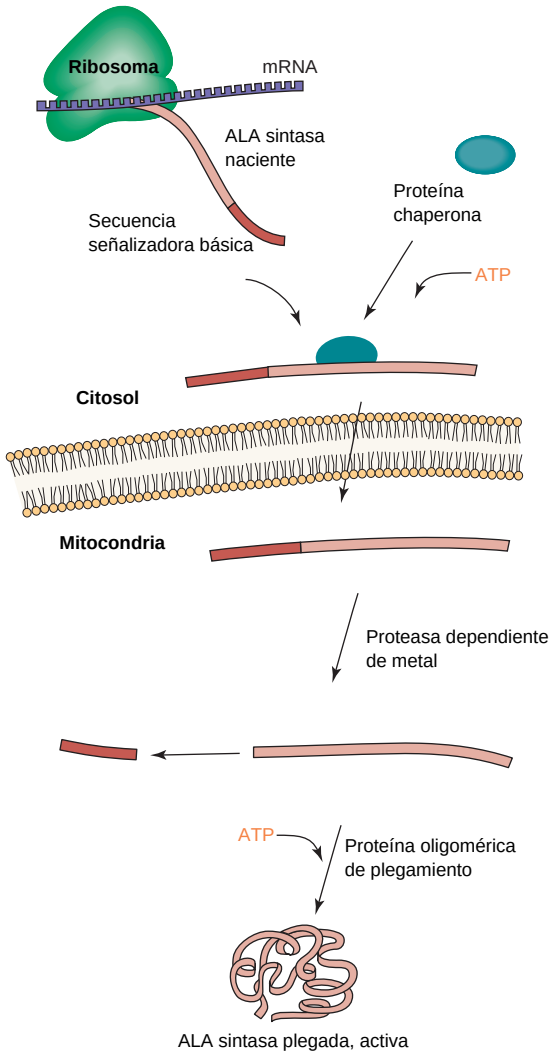


FIGURA 24.9
Síntesis de la ácido δ-aminolevulínico (ALA) sintasa.

Ácido aminolevulínico deshidratasa

La **ácido aminolevulínico deshidratasa** (280 kDa) es un componente citosólico que consta de ocho subunidades, de las que sólo cuatro interaccionan con el sustrato. Esta proteína también interacciona con el sustrato formando una base de Schiff, pero en este caso es el grupo **ϵ**-amino de un residuo de lisina el que interacciona con el carbono cetónico de una molécula de sustrato (Figura 24.10). Dos moléculas de ALA se condensan de forma asimétrica para formar el **porfobilinógeno**. La ALA deshidratasa es un enzima que contiene zinc y es muy sensible a la inhibición por metales pesados, especialmente el plomo. Un síntoma característico del **envenenamiento por plomo** es el incremento de ALA en ausencia de un incremento de porfobilinógeno.

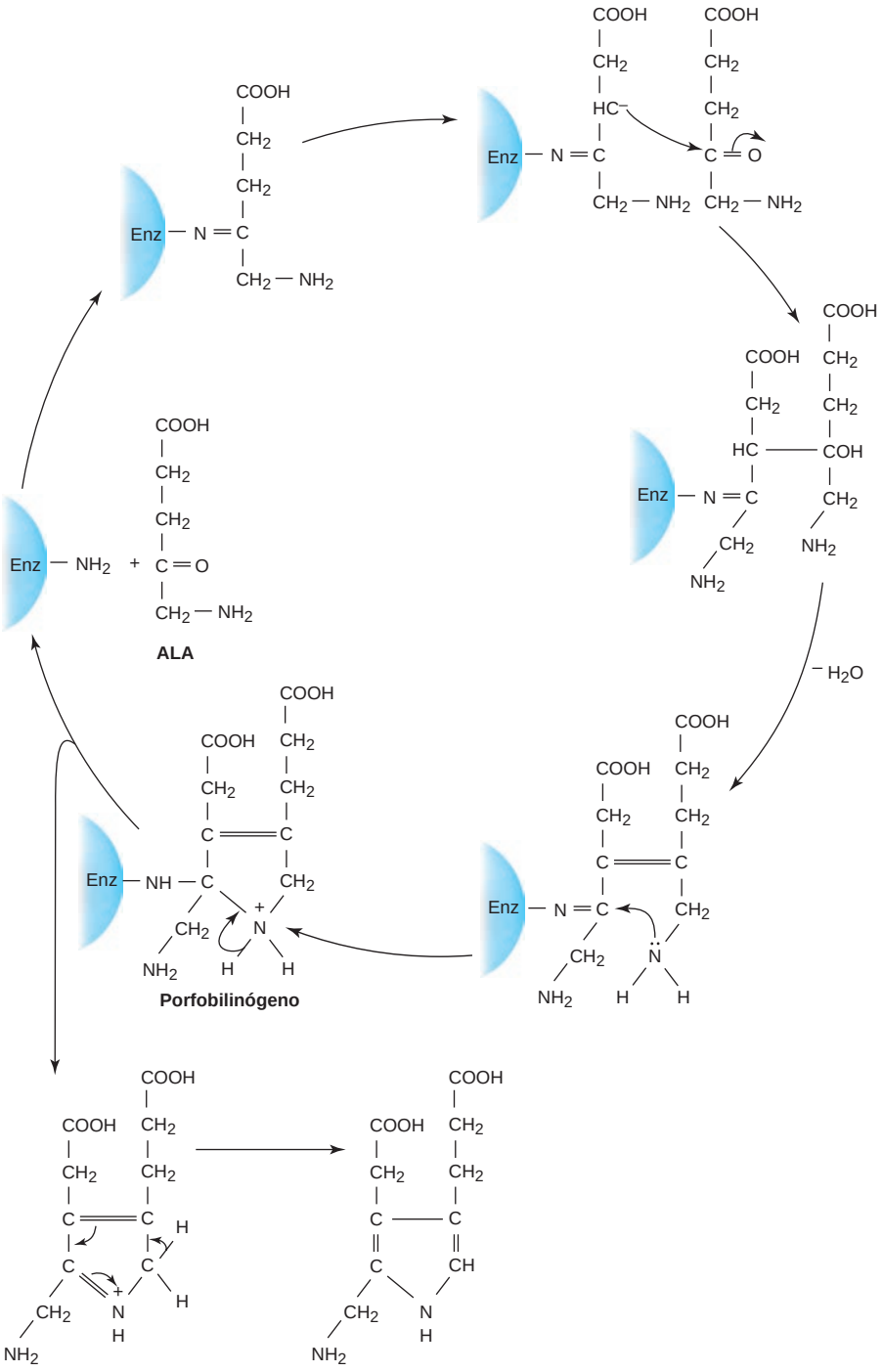


FIGURA 24.10
Síntesis del porfobilinógeno.

Porfobilinógeno desaminasa y uroporfirinógeno III sintasa

La síntesis del anillo de porfirina es un proceso complejo, que ha sido definido recientemente. Un grupo sulfhidrilo en la **porfobilinógeno desaminasa** forma un enlace tioéter con un residuo de porfobilinógeno a través de una reacción de desaminación. A continuación se desaminan cinco residuos de porfobilinógeno adicionales para formar un aducto hexapirrólico lineal con el enzima. El aducto se rompe hidrolíticamente formando un complejo enzima–dipirrolmetano y el tetrapirrol lineal o hidroximetilbilano. El complejo enzima–dipirrolmetano está preparado para entrar en otro ciclo de adición de otros cuatro residuos de porfobilinógeno, dando lugar a otro tetrapirrol. Así, el dipirrolmetano unido covalentemente es el nuevo cofactor del enzima. La porfobilinógeno desaminasa no tiene como misión cerrar el anillo; el hidroximetilbilano se cierra en una etapa independiente de enzimas, para dar lugar a uroporfirinógeno I, siempre que no se encuentren presentes otros factores adicionales. Sin embargo, la desaminasa se encuentra estrechamente asociada con una segunda proteína, la **uroporfirinógeno III sintasa**, la cual dirige la síntesis del isómero III. La formación de este compuesto pasa por un intermedio espiránico generado a partir del hidroximetilbilano, lo cual permite la inversión de uno de los grupos pirrol (véase Figura 24.11). En ausencia de la uroporfirinógeno III

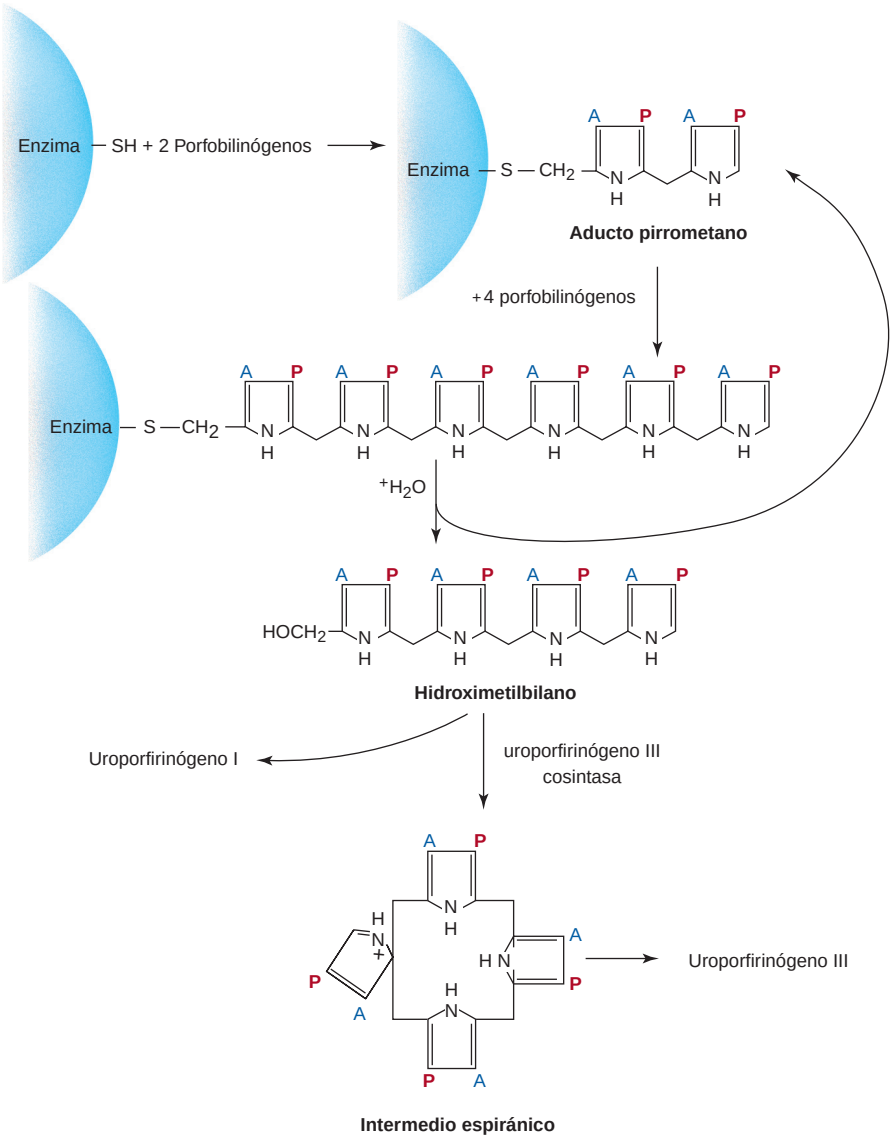


FIGURA 24.11
Síntesis de los uroporfirinógenos I y III.
El enzima indicado en azul es la uroporfirinógeno I sintasa.

sintasa, la síntesis del uroporfirinógeno I es lenta; en su presencia, se produce una rápida síntesis del isómero III. Existe una enfermedad hereditaria recesiva poco frecuente, la porfiria eritropoyética, asociada con una marcada sensibilidad cutánea a la luz, que es debida a una anomalía en la uroporfirinógeno III sintasa de los reticulocitos. En ella se produce la síntesis de grandes cantidades de los isómeros de tipo I de uroporfirinógeno y coproporfirinógeno en la médula ósea. Existen dos isozimas de la porfobilinógeno desaminasa, debido a un corte y empalme alternativo del exón 1 o del 2 con el resto del mRNA.

Uroporfirinógeno descarboxilasa

La **uroporfirinógeno descarboxilasa** actúa sobre las cadenas laterales de los uroporfirinógenos para formar los coproporfirinógenos. La proteína cataliza la conversión de los isómeros I y III del uroporfirinógeno en los respectivos isómeros del coproporfirinógeno. Las sales de hierro inhiben a la uroporfirinógeno descarboxilasa. Desde el punto de vista clínico, la causa más frecuente de trastorno de las porfirinas está asociada a pacientes que tienen una única anormalidad en el gen de este enzima, lo que produce una disminución del 50% de la actividad enzimática. Esta enfermedad, que presenta principalmente manifestaciones cutáneas con sensibilidad a la luz, se conoce como **porfiria cutánea tardía**. La patología no se manifiesta a menos que los pacientes tomen fármacos que produzcan un incremento de la síntesis de porfirinas, o beban grandes cantidades de alcohol, lo que produce acumulación de hierro y ello inhibe aún más la actividad de la uroporfirinógeno descarboxilasa.

Coproporfirinógeno oxidasa

La **coproporfirinógeno oxidasa** es un enzima mitocondrial específico para el isómero tipo III del coproporfirinógeno y no actúa sobre el isómero tipo I. El coproporfirinógeno III entra en la mitocondria, en donde es convertido en protoporfirinógeno IX. No se conoce el mecanismo de acción. Una enfermedad hereditaria dominante asociada a una deficiencia de este enzima conduce a una forma de porfiria hepática hereditaria conocida como **coproporfiria hereditaria**.

Protoporfirinógeno oxidasa

La **protopofirinógeno oxidasa** es otro enzima mitocondrial que genera la protoporfirina IX, que, a diferencia de otros precursores del hemo, es muy insoluble en agua. Las cantidades de protoporfirina IX en exceso que no se convierten en hemo se excretan por el sistema biliar al tracto intestinal. Existe una enfermedad dominante, la **porfiria jaspeada**, que se debe a una deficiencia de protoporfirinógeno oxidasa.

Ferroquelatasa

La **ferroquelatasa** inserta hierro ferroso en la protoporfirina IX en el paso final de la síntesis de hemo. Para esta actividad son necesarias sustancias reductoras. La proteína es sensible a los efectos de metales pesados (especialmente plomo) y, por supuesto, a la falta de hierro. En estos últimos casos se incorpora zinc en lugar de hierro, formando un complejo zinc–protoporfirina IX. A diferencia del hemo, el complejo zinc–protoporfirina IX presenta una gran fluorescencia y es fácilmente detectable en pequeñas cantidades. La ferroquelatasa procariótica no contiene grupos prostéticos. Sin embargo, el enzima de mamíferos contiene un grupo Fe_2S_2.

La ALA sintasa cataliza la etapa limitante de la biosíntesis del hemo

La ALA sintasa controla el paso limitante de velocidad de la síntesis del hemo en todos los tejidos. El succinil CoA y la glicina son sustratos de diversas reacciones. La regulación de la actividad ALA sintasa determina la cantidad de sustratos que serán desviados hacia la biosíntesis del hemo. El hemo (y también la hematina) actúan tanto como represores de la síntesis de ALA sintasa como inhibidores de su actividad. Dado que el hemo no presenta parecido ni con los sustratos ni con el producto de la acción del enzima, es probable que la inhibición tenga lugar en un centro alostérico. Existen casi 100 fármacos y metabolitos diferentes que pueden provocar la inducción de ALA sintasa; por ejemplo, después de tratar una rata con 3,5-dicarbetoxi-1,4-dihidrocolidina, se observa un aumento de 40 veces en la actividad ALA sintasa. El efecto de los agentes farmacológicos ha producido el impor-

tante rasgo clínico por el que los pacientes con ciertas clases de porfiria han sufrido exacerbaciones de su condición después de la administración inadecuada de ciertos fármacos (p. ej., barbituratos). La ALA deshidratasa también es inhibida por el hemo, aunque tiene pocas consecuencias fisiológicas, ya que la actividad de la ALA deshidratasa es unas 80 veces superior a la de la ALA sintasa, por lo que los efectos inhibidores del hemo se reflejan primero en la actividad de la ALA sintasa.

La glucosa, o uno de sus metabolitos próximos, sirve para inhibir la biosíntesis del hemo mediante un mecanismo aún no definido. Esto tiene su importancia clínica, ya que algunos pacientes manifiestan su estado porfírico por primera vez cuando se les somete a una ingestión de muy bajo contenido calórico (y por consiguiente de glucosa). Entre otros reguladores del metabolismo de las porfirinas se cuentan ciertos esteroides. Las hormonas esteroides (p. ej., las píldoras anticonceptivas orales) con un doble enlace en el anillo A entre los átomos de carbono 4 y 5 pueden ser reducidas por dos reductasas diferentes. El producto de la reducción 5α tiene poco efecto sobre la biosíntesis del hemo; sin embargo, el producto de la reducción 5β sirve de estímulo para la síntesis de la ALA sintasa.

24.7 CATABOLISMO DEL HEMO

El catabolismo de las proteínas que contienen hemo presenta dos requisitos para el mamífero huésped: (1) el desarrollo de medios para modificar los productos hidrofóbicos de la rotura del anillo de la porfirina y (2) la retención y movilización del hierro que éstos contienen para que pueda ser reutilizado. La vida de los eritrocitos es de aproximadamente 120 días. Las células senescentes se reconocen por sus cambios en la membrana y son extraídas y englobadas por el sistema reticuloendotelial en lugares extravasculares. Las cadenas de globina se desnaturalizan liberando el hemo al citoplasma. La globina se degrada a sus aminoácidos constituyentes, que son reutilizados para las necesidades metabólicas generales.

La Figura 24.12 representa la secuencia de pasos del catabolismo del hemo. El hemo se degrada principalmente mediante un sistema enzimático microsómico en las células reticuloendoteliales que requiere oxígeno molecular y NADPH. La **hemooxigenasa** es inducible por el sustrato y cataliza la rotura del puente meteno α, que une los dos residuos pirrólicos que contienen los sustituyentes vinílicos. El carbono del meteno α se convierte en monóxido de carbono de forma cuantitativa. La única fuente endógena de **monóxido de carbono** en el ser humano es el carbono del meteno α. Una parte del monóxido de carbono se libera por el tracto respiratorio. De este modo, la medida del monóxido de carbono en el aliento proporciona un índice de la cantidad de hemo que se degrada en un individuo. El oxígeno presente en el monóxido de carbono, así como en los anillos lactámicos recién derivatizados, provienen en su totalidad del oxígeno molecular. La estequiometría de la reacción requiere 3 moles de oxígeno para la rotura de cada anillo. La hemooxigenasa sólo utiliza como sustrato el hemo, y es posible que el hierro participe en el mecanismo de rotura. Así, la protoporfirina IX libre no es sustrato. El tetrapirrol lineal **biliverdina IX** es el producto formado por la acción de la hemooxigenasa. La biliverdina IX se reduce a **bilirrubina IX** por acción de la **biliverdina reductasa**.

La bilirrubina se conjuga en el hígado para formar bilirrubina diglucurónido

La **bilirrubina** proviene no sólo de los hematíes senescentes, sino también del recambio de otras hemoproteínas, tales como los citocromos. Los estudios con glicina marcada como precursor han revelado que después de la administración de un pulso del precursor marcado aparece muy pronto una bilirrubina marcada tempranamente con un pico en un intervalo de 1–3 h. Una cantidad de bilirrubina mucho mayor, que refleja el recambio del hemo en los eritrocitos, aparece mucho más tardíamente, alrededor de los 120 días. La bilirrubina marcada tempranamente puede dividirse en dos partes: una parte muy temprana que refleja el recambio de hemoproteínas en el hígado, y una parte temprana–tardía que consiste tanto en el recambio de las hemoproteínas hepáticas, como en el recambio del hemo de la médula ósea que, o bien se incorpora deficientemente, o bien se libera fácilmente de

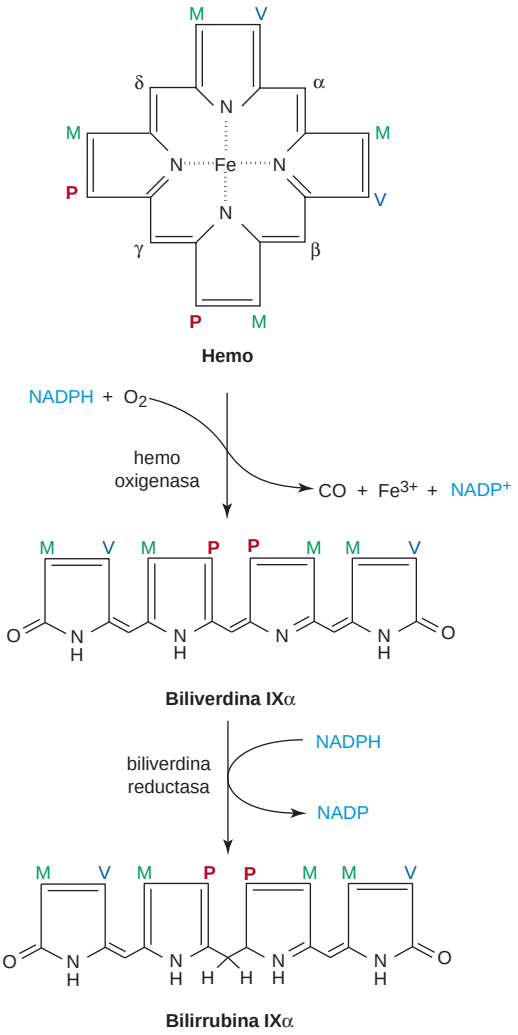


FIGURA 24.12
Formación de la bilirrubina a partir del hemo.
Las letras griegas indican la nomenclatura de los carbonos meteno del hemo.

los hematíes. Esto último es una característica de la eritropoyesis ineficiente, que puede ser muy pronunciada en estados patológicos tales como la anemia perniciosa y las talasemias.

La bilirrubina es poco soluble en soluciones acuosas a pH fisiológico. Cuando se transporta en el plasma está unida a la albúmina sérica con una constante de asociación superior a 10^6 M^{-1}. La albúmina contiene un sitio de afinidad elevada de este tipo y otro con una afinidad menor. A la concentración normal de albúmina de 4 g dL^{-1}, se pueden unir 70 mg de bilirrubina por dL de plasma entre los dos centros. No obstante, la toxicidad por la bilirrubina (**quernictero**) que se manifiesta mediante la transferencia de bilirrubina a los lípidos de la membrana tiene lugar habitualmente a concentraciones superiores a 25 mg dL^{-1}. Esto sugiere que la débil afinidad del segundo sitio no le permite actuar efectivamente en el transporte de bilirrubina. La bilirrubina de la albúmina sérica es eliminada rápidamente en el hígado, en el que existe un flujo bidireccional libre del tetrapirrol a través de la interfase sinusoide–hepatocito. Una vez en el hepatocito, la bilirrubina se fija a diversas proteínas citosólicas, de las que sólo una está bien caracterizada. Este componente, la **ligandina**, es una proteína básica pequeña que constituye el 6% de la proteína citosólica total del hígado de rata. Se ha purificado la ligandina hasta homogeneidad a partir de hígado de rata; está formada por dos subunidades de masas moleculares 22 kDa y 27 kDa. Cada subunidad contiene actividad glutatión *S*-epóxido transferasa, función que es importante en los mecanismos de destoxificación

de grupos arilo. La estequiometría de fijación es de una molécula de bilirrubina por molécula de ligandina completa.

Una vez en el hepatocito, las cadenas laterales propionilo de la bilirrubina se conjugan formando un diglucurónido (véase Figura 24.13). La reacción utiliza uridina difosfoglucuronato, proveniente de la oxidación de uridina difosfoglucosa. Aquélla sirve de donadora de glucuronato para la bilirrubina. En la bilis normal, el diglucurónido es la forma principal de bilirrubina excretada, y sólo pequeñas cantidades del monoglucurónido y otros aductos glucosídicos están presentes en ella. La **bilirrubina diglucurónido** es mucho más hidrosoluble que la bilirrubina libre, con lo que la transferasa facilita la excreción de la bilirrubina a la bilis. La bilirrubina diglucurónido es poco absorbida por la mucosa intestinal. Los residuos glucurónidos se liberan en el íleo terminal y en el intestino grueso por hidrolasas bacterianas, y la bilirrubina libre se reduce dando los tetrapirroles incoloros y lineales conocidos como **urobilinógenos**. Los urobilinógenos se pueden oxidar dando productos coloreados conocidos como **urobilinas**, que se excretan con las heces. Una pequeña parte del urobilinógeno se puede reabsorber por el íleo terminal y por el intestino grueso para ser eliminado por el hígado y resecretado a la bilis. Cuando en ciertos estados patológicos el urobilinógeno se reabsorbe en grandes cantidades el riñón actúa como punto principal de excreción.

En el estado normal, las concentraciones de bilirrubina plasmática son de 0,3–1 mg dL^{-1} estando casi toda en forma no conjugada. En el contexto clínico la bilirrubina conjugada se expresa como **bilirrubina directa**, ya que se acopla fácilmente con sales de diazonio para dar colorantes azoicos; ésta es la **reacción directa de van den Bergh**. La bilirrubina no conjugada se fija no covalentemente a la albúmina y no reacciona hasta que se libera mediante la adición de un disolvente orgánico tal como el etanol. La reacción con las sales de diazonio que dan el colorante azoico después de la adición de etanol es la reacción de van den Bergh indirecta que mide la **bilirrubina** no conjugada o **indirecta**. La bilirrubina no conjugada se une tan fuertemente a la albúmina sérica y al lípido que no difunde libremente al plasma y, por consiguiente, no produce un aumento de bilirrubina en la orina. La bilirrubina sin conjugar presenta una gran afinidad por los lípidos de la membrana, lo que

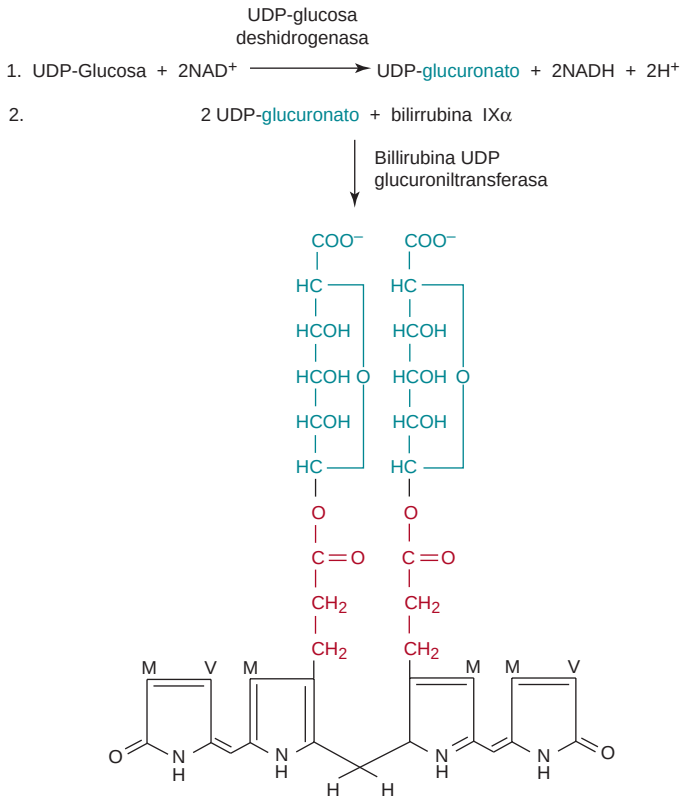
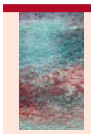


FIGURA 24.13
Síntesis del diglucurónido de bilirrubina.



APLICACIÓN CLÍNICA 24.11
Hemólisis isoinmune neonatal

Las mujeres embarazadas Rh-negativas con fetos Rh-positivos forman anticuerpos contra los factores Rh. Estos anticuerpos cruzan la placenta hemolizando los hematíes fetales. Habitualmente esto no tiene importancia clínica hasta el tercer embarazo Rh-positivo en el que la madre ya ha tenido confrontaciones antigénicas con los bebés anteriores. Los estudios antenatales revelarán títulos maternos de anticuerpos IgG contra los hematíes Rh positivos que van aumentando, lo que indica que el feto es Rh positivo. Antes del nacimiento tiene lugar la transferencia placentaria de bilirrubina fetal que se excreta a través del hígado materno. Debido a que los enzimas hepáticos del metabolismo de la bilirrubina se hallan en poca cantidad en el recién nacido, los lactantes no pueden excretar las grandes cantidades de bilirrubina que se pueden generar por la rotura de los hematíes. Al nacer estos niños parecen normales; sin embargo, la bilirrubina no conjugada en la sangre del cordón umbilical está incrementada hasta 4 mg dL^{-1}, debido a la hemólisis iniciada por los anticuerpos maternos. Durante los 2 días siguientes aumenta el nivel sérico de bilirrubina, lo que refleja una hemólisis isoinmune continua, que da lugar a ictericia, hepatoesplenomegalia, ascitis y edemas. Si no se administra tratamiento, pueden aparecer síntomas de lesiones en el sistema nervioso central, con aparición de letargia, hipotonía, parálisis y dificultades respiratorias, constituyendo todo ello el síndrome de querníctero. El tratamiento supone transfusión de intercambio con sangre completa que sea serológicamente compatible tanto con la sangre del niño como con el suero materno. Este último requisito es necesario para impedir la hemólisis de las células transfundidas. El tratamiento adicional incluye la fototerapia externa que facilita la degradación de la bilirrubina. El problema global puede prevenirse tratando a las madres Rh negativas con globulina anti-Rh. Estos anticuerpos reconocen a los eritrocitos fetales, bloquean los antígenos Rh, y provocan su destrucción sin inducir respuesta inmune alguna en las madres.

Maur, H. M., Shumway, C. N., Draper, D. A. y Hossaini, A. Controlled trial comparing agar, intermittent phototherapy, and continuous phototherapy for reducing neonatal hyperbilirubinemia. *J. Pediatr.* 82:73, 1973; Bowman, J. J. Management of Rh-isoimmunization. *Obstet. Gynecol.* 52:1, 1978; y Dennery, P. A., Seidman, D. S. y Stevenson, D. K. Neonatal hyperbilirubinemia. *N. Engl. J,. Med.* 344:581, 2001.

lleva al deterioro de las funciones de la membrana celular, especialmente en el sistema nervioso. Por el contrario, la bilirrubina conjugada es relativamente hidrosoluble y el aumento de esta forma de bilirrubina produce concentraciones elevadas en la orina, dándole el consiguiente color amarillo–marrón oscuro característico. La deposición de bilirrubina conjugada y sin conjugar en la piel y en la esclerótica produce el color amarillo a amarillo verdoso que se observa en pacientes con ictericia.

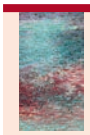
Una tercera forma de bilirrubina plasmática se presenta únicamente en enfermedades hepatocelulares en las que una fracción de bilirrubina se une tan fuertemente que no puede liberarse de la albúmina sérica mediante las técnicas habituales, y se cree que se encuentra unida covalentemente a la proteína. En algunos casos, hasta un 90% de la bilirrubina total se puede encontrar unida covalentemente en esta forma.

El hígado normal tiene una capacidad muy grande para conjugar y movilizar la bilirrubina que recibe. En consecuencia, la hiperbilirrubinemia debida al exceso de destrucción de hemo, tal como se da en las enfermedades hemolíticas, pocas veces da lugar a niveles de bilirrubina que excedan 5 mg dL^{-1}, excepto en los casos en los que existe un trastorno funcional del hígado (véase Apli. Clín. 24.11). Así, el aumento marcado de bilirrubina sin conjugar refleja principalmente una serie de enfermedades hepáticas, entre ellas las congénitas y las adquiridas (véase Apli. Clín. 24.12).

Los aumentos de los niveles plasmáticos de bilirrubina conjugada son atribuibles a enfermedad del hígado o del tracto biliar. En la obstrucción simple sin complicaciones del tracto biliar, el principal componente de la bilirrubina sérica incrementada es la forma diglucurónido, que es liberada por el hígado al compartimiento vascular. La enfermedad del tracto biliar puede ser extrahepática o intrahepática, estando implicados en esta última los canalículos y conductos biliares (véase Apli. Clín. 24.13).

La hemólisis intravascular requiere la recuperación del hierro

En ciertas enfermedades se produce la destrucción de los hematíes en el compartimiento intravascular y no en las células reticuloendoteliales extravasculares. En el primer caso, la aparición de hemoglobina libre y hemo en el plasma podría llevar a la excreción de estas sustancias a través del riñón con una pérdida importante de hierro. Con el fin de evitar esta situación, existen proteínas plasmáticas específicas implicadas en mecanismos de recuperación. La transferrina fija el hierro libre, permitiendo así su reutilización. La hemoglobina libre, después de la oxigenación en los capilares pulmonares, se disocia en dímeros α,β, los cuales se unen a una familia de

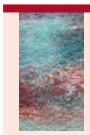


APLICACIÓN CLÍNICA 24.12
Deficiencia de bilirrubina-UDP-glucuronosiltransferasa

Existen dos isozimas para la bilirrubina UDP-glucuronosiltransferasa, derivadas de un corte y empalme alternativo del mRNA entre formas variables del exón 1 y las formas comunes de los exones 2, 3, 4 y 5. Estos últimos exones definen la región de la proteína que se une al UDP-glucuronato, mientras que los diferentes exones 1 definen la especificidad para la bilirrubina o para otros aceptores tales como el fenol. Dos exones tienen especificidad para la bilirrubina, dando lugar a dos formas de bilirrubina-UDP-glucuronosiltransferasa. Las deficiencias de este enzima se han relacionado con dos familias principales de enfermedades. El síndrome de Crigler–Najjar, observado en niños, se caracteriza por unos niveles séricos de bilirrubina no conjugada extraordinariamente elevados, causados por la herencia autosómica recesiva en ambos alelos de mutaciones sobre los exones 2, 3, 4 ó 5. El síndrome de Gilbert también se asocia con una deficiencia de la actividad enzimática, si bien ésta disminuye sólo hasta un 25% de la normalidad. Los pacientes muestran ictericia, sin desarrollar ningún síntoma clínico adicional. La principal complicación proviene del no reconocimiento, tras exámenes exhaustivos realizados por el médico en busca de una alteración hepática grave, de la condición benigna de la enfermedad. En la enfermedad influyen dos descubrimientos que pueden estar limitados a diferentes poblaciones. Se ha detectado en Japón un patrón de herencia dominante que presenta una mutación en un solo alelo. El enzima se encuentra en forma de oligómero en el que se asocian monómeros mutantes y normales que formarían un heterooligómero, lo cual explicaría el 75% observado de reducción en la actividad. La causa puede ser el hecho de que no sólo el monómero mutante es inactivo, sino que fuerza la conformación de la subunidad normal, reduciendo considerablemente su actividad. Por otro lado, la enfermedad en Occidente se debe en gran medida a una expansión homozigótica de las bases de la región promotora que dan lugar a una menor eficiencia en la transcripción del gen.

Aono, S., Adachi, Y., Uyama, S., et al. Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *Lancet* 345:958, 1995; Bosma, P. J., Chowdhury, J. R., Bakker, C., et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333:1171, 1995; y Burchell, B. y Hume, R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14: 960, 1999.

proteínas plasmáticas circulantes, las **haptoglobinas**, que tienen una gran afinidad hacia el dímero de la oxihemoglobina. Dado que la desoxihemoglobina no se disocia en dímeros en el entorno fisiológico, no es fijada por las haptoglobinas. La estequiometría de la fijación es de dos dímeros α,β de oxihemoglobina por molécula de haptoglobina. Se han realizado estudios interesantes con anticuerpos de conejo antihemoglobina humana sobre la interacción haptoglobina–hemoglobina. La haptoglobina humana interacciona con diversas hemoglobinas de diferentes especies. La unión de la haptoglobina humana con la hemoglobina humana no se ve afectada por la unión del anticuerpo de conejo antihemoglobina humana. Estos estudios sugieren



APLICACIÓN CLÍNICA 24.13
Aumento de la bilirrubina plasmática conjugada

El aumento de la bilirrubina plasmática conjugada se atribuye a enfermedades hepáticas o biliares. En una obstrucción simple sin complicaciones del conducto biliar, el principal componente de esta bilirrubina sérica que se encuentra elevada es la forma diglucurónido, liberada por el hígado al espacio vascular. Las enfermedades del tracto biliar pueden ser extrahepáticas o intrahepáticas, implicando la última el canalículo biliar y el conducto biliar.

Los compuestos hidrofóbicos tienen una afinidad por las membranas y por tanto penetran en las células. Para eliminar estos compuestos, canales de membrana dependientes de ATP los bombean al torrente circulatorio, donde pueden unirse a la albúmina sérica y ser transferidos al hígado. Estas bombas se decribieron inicialmente en el contexto de la quimioterapia del cáncer, en que los agentes utilizados son habitualmente hidrofóbicos, y se utilizan en concentraciones elevadas. De acuerdo con ello, estas bombas se han denominado MRP (proteínas de resistencia multifármaco). Se conocen por lo menos seis tipos (véase p. 525). La propiedad de la hidrofobicidad reduce la necesidad de una bomba específica para cada compuesto, ya que la captura desde una solución acuosa diluída es una cuestión menor, en contraste con los compuestos hidrofílicos para el que los canales tienen que ser muy específicos. Las MRP sirven también para tranferir fisiológicamente compuestos hidrofóbicos tales como esteroides de la glándula adrenal y bilirrubina desde los hepatocitos a la bilis. El síndrome de Dubin–Johnson es una enfermedad autosómica recesiva en la que está implicado un defecto en el mecanismo secretor biliar del hígado. La excreción desde el hepatocito al canalículo depende de la MRP 2. En el síndrome de Dubin-Johnson tienen lugar mutaciones en esta proteína (conocida también como cMOAT, transportador canalicular de aniones orgánicos multiespecífico). En ella está afectada la excreción a través del tracto biliar de una serie de aniones orgánicos (aunque no de todos). La retención en el hígado de un pigmento parecido a la melanina produce un color gris–negro característico de este órgano. Una segunda enfermedad congénita asociada a niveles elevados de bilirrubina plasmática conjugada es el síndrome de Rotor. En esta enfermedad poco definida no se produce pigmentación hepática.

Iyanagi, E. Y. y Accoucheur, S. Biochemical and molecular disorders of bilirubin metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1407:173, 1998; *Hepatology* 15:1154,1992; y Tsugi, H., Konig, J., Rost, D., et al. Exon–intron organization of the human multidrugresistance protein 2 (MRP 2) gene mutated in Dubin–Johnson syndrome. *Gastroenterology* 117:653, 1999.

que la haptoglobina se fija en sitios de la hemoglobina que están muy conservados durante la evolución y que, por tanto, no son suficientemente antigénicos para generar anticuerpos. El lugar más probable para que se produzca la interacción molecular de la hemoglobina y la haptoglobina es la interfase de las globinas α y β del tetrámero que se disocia dando los dímeros α,β. La determinación de secuencias indica que estas regiones de contacto están muy conservadas durante la evolución.

Las haptoglobinas son α_2-globulinas. Sintetizadas en el hígado, consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas (siendo α la más ligera y β la más pesada). Las cadenas α y β provienen de un solo mRNA, el cual genera una única cadena polipeptídica que es cortada para formar las dos cadenas diferentes. Las cadenas β son glucopéptidos de 39 kDa, invariables en estructura; las cadenas α son de diversos tipos. Las cadenas peptídicas de la haptoglobina se unen mediante enlaces disulfuro entre las cadenas α y β y entre las dos cadenas α.

La interacción de la haptoglobina con la hemoglobina conduce a un complejo que es demasiado grande para filtrar a través del glomérulo renal. En la hemólisis intravascular aparece hemoglobina libre (en los túbulos renales y en la orina) solamente cuando se ha superado la capacidad de fijación de la haptoglobina circulante. La haptoglobina transporta la hemoglobina a las células reticuloendoteliales. El hemo en la hemoglobina libre es relativamente resistente a la acción de la hemooxigenasa, mientras que los residuos hemo de un dímero α,β de la hemoglobina unidos a la haptoglobina son muy susceptibles.

La medición de la haptoglobina sérica se utiliza clínicamente como indicación del grado de hemólisis intravascular. Los pacientes que sufren una hemólisis intravascular significativa tienen niveles bajos de haptoglobina, incluso carencia de ella, debido a la eliminación de los complejos haptoglobina–hemoglobina por el sistema reticuloendotelial. Los niveles de haptoglobina también pueden ser bajos en la hemólisis extravascular grave, en la que la gran carga de hemoglobina en el sistema reticuloendotelial conduce a la transferencia de hemoglobina libre al plasma.

El hemo libre y la hematina que aparecen en el plasma son fijados por una β-globulina, la **hemopexina** (57 kDa). Se fija un residuo de hemo por molécula de hemopexina. La hemopexina transfiere el hemo al hígado, en donde el hemo continúa el metabolismo con la hemooxigenasa. En estado normal, la hemopexina plasmática contiene muy poco hemo unido, mientras que en la hemólisis intravascular la hemopexina está casi totalmente saturada por hemo, siendo eliminada después de una vida media de 7 h. En este último caso, el exceso de hemo se fija a la albúmina, mientras que la hemopexina recién sintetizada actúa como mediador para la transferencia del hemo desde la albúmina al hígado. La hemopexina también fija protoporfirina libre.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, K. E., Sassa, S., Bishop, D. F. y Desnick, R. J. Disorders of Heme Biosynthesis: X-Linked Sideroblastic Anemia and the Porphyrias. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed., Vol II. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 2991.

Andrews, N. C. Medical Progress. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341:1986,1999.

Battersby, A. R. The Bakerian Lecture, 1984. Biosynthesis of the pigments of life. *Proc. R. Soc. London B* 225:1, 1985.

Beutler, E., Bothwell, T. M., Charlton, R. W. y Motulsky, A. G. Hereditary Hemochromatosis. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed., Vol II, New York: McGraw-Hill, 2001, p. 3127.

Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L. y Sigler, P. B. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371:578, 1994.

Casey, J. L., Hentze, M. W., Koeller, D. H., Caughman, S., Rouault, T. A., Klausner, R. D. y Harford, J. B. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 240:924, 1988.

Chowdhury, J. R., Wolkoff, A. W., Chowdhury, N. R. y Irias, I. M. Hereditary Jaundice and Disorders of Bilirubin Metabolism. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed., Vol. II, New York: McGraw-Hill, 2001, p. 3063.

Eisenstein, R. S. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20:627, 2000.

Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K. y Horwich, A. L. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* 371:614, 1994.

Ferreira, G. C. Ferrochelatase binds the iron-responsive element present in the erythroid δ-aminolevulinate synthase mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:875, 1995.

Fleet, J. C. A new role for lactoferrin: DNA binding and transcription activation. *Nutr. Rev.* 53:226, 1995.

Guo, B., Phillips, J. D., Yu, Y. y Leibold, E. A. Iron regulates the intracelluar degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 270:21645, 1995.

Hartl, F. U. Secrets of a double-doughnut. *Nature* 371:557, 1994.

Huebers, H. A. y Finch, C. A. Transferrin: physiologic behavior and clinical implications. *Blood* 64:763, 1984.

Lieu, P. T., Heiskala, M., Peterson, P. A., et al. The role of iron in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 22:1, 2001.

Lustbader, J. W., Arcoleo, J. P., Birken, S. y Greer, J. Hemoglobin-binding site on haptoglobin probed by selective proteolysis. *J. Biol. Chem.* 258:1227, 1983.

Maeda, N., Yang, F., Barnett, D. R., Bowman, B. H. y Smithies, O. Duplication within the haptoglobin *Hp2* gene. *Nature* 309:131, 1984.

Mascotti, D. P., Rup, D. y Thach, R. E. Regulation of iron metabolism: translational effects mediated by iron, heme, and cytokines. *Annu. Rev. Nutr.* 15:239, 1995.

May, W. S., Sahyoun, N., Jacobs, S., Wolf, M. y Cuatrecasas, P. Mechanism of phorbol-diester-induced regulation of surface transferrin receptor involves the action of activated protein kinase C and an intact cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 260:9419, 1985.

Melefors, O. y Hentze, M. W. Iron regulatory factor—the conductor of cellular iron regulation. *Blood Rev.* 7:251, 1993.

Osterman, J., Horwich, A. L., Neupert, W. y Hartl, F.-U. Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* 341:125, 1989.

Pantopoulos, K., Gray, N. K. y Hentze, M. W. Differential regulation of two related RNA-binding proteins, iron regulatory protein (IRP) and IRP_B. *RNA* 1:155, 1995.

Pantopoulos, K. y Hentze, M. W. Nitric oxide signalling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1267, 1995.

Theil, E. L. y Eisenstein, R. S. Combinatorial mRNA regulation: iron regulatory proteins and iso-iron responsive elements (isoIREs). *J. Biol. Chem.* 275, 40659 (2000).

Weiss, J. S., et al. The clinical importance of a protein-bound fraction of serum bilirubin in patients with hyperbilirubinemia. *N. Engl. J. Med.* 309:147, 1983.

Yamashiro, D. J., Tycko, B., Fluss, S. R. y Maxfield, F. R. Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 37:789, 1984.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

Referirse a lo siguiente para las preguntas 1–3:

A. ferritina.
B. ferredoxina.
C. hemosiderina.
D. lactoferrina.
E. transferrina.

1. Un tipo de proteína en la que el hierro se encuentra unido de forma específica al azufre.
2. Principal proteína responable del almacenamiento de hierro.
3. Transporta hierro a los tejidos tras la unión a receptores específicos de la superficie celular.

4. En la absorción intestinal del hierro:
   A. la presencia de un reductor tal como el ascorbato favorece la disponibilidad del hierro.
   B. la regulación de la captación del hierro se da entre la luz y las células de la mucosa.
   C. la cantidad de apoferritina sintetizada en las células de la mucosa está directamente relacionada con la necesidad de hierro que presenta el huésped.
   D. el hierro unido fuertemente a un ligando, como el fitato, se absorbe más rápidamente que el hierro libre.
   E. el bajo pH del estómago inhibe la absorción favoreciendo la forma Fe^{3+}.

5. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones acerca de la distribución del hierro es correcta?
   A. el exceso de hierro no se puede dar, ya que existen mecanismos de excreción muy eficientes.
   B. las células no pueden regular la absorción de hierro frente a concentraciones cambiantes de éste.
   C. la transferrina disminuye durante la carencia de hierro para facilitar el almacenamiento de éste.
   D. la homeostasis del hierro está mantenida en parte por proteínas reguladoras de hierro que se unen a elementos de respuesta al hierro en el mRNA.
   E. en las etapas tempranas de gasto de los depósitos de hierro los niveles de ferritina aumentan rápidamente a medida que el hierro es liberado a partir de las formas almacenadas.

6. La biosíntesis del hemo requiere todo lo siguiente, EXCEPTO:
   A. ácido propiónico.
   B. succinil CoA.
   C. glicina.
   D. ion ferroso.

7. El envenenamiento por plomo debería dar niveles elevados de:
   A. ácido aminolevulínico.
   B. porfobilinógeno.
   C. protoporfirina I.
   D. hemo.
   E. bilirrubina.

8. La ferroquelatasa:
   A. es un compuesto quelante de hierro.
   B. libera hierro a partir del hemo en la degradación de la hemoglobina.
   C. une hierro a iones sulfuro y residuos de cisteína.
   D. se inhibe por metales pesados.
   E. interviene en la porción citoplasmática de la síntesis del hemo.

9. La hemooxigenasa:
   A. puede oxidar los puentes meteno entre dos anillos pirrólicos cualesquiera del hemo.
   B. requiere oxígeno molecular.
   C. produce bilirrubina.
   D. produce dióxido de carbono.
   E. puede utilizar tanto hemo como protoporfirina IX como sustratos.

10. La haptoglobina:
    A. ayuda a prevenir la pérdida de hierro tras la destrucción intravascular de eritrocitos.
    B. sus niveles séricos aumentan en la hemólisis intravascular grave.
    C. inhibe la acción de la hemooxigenasa.
    D. se une a hemo y a hematina, así como a hemoglobina.
    E. se une al dímero de α,β-desoxihemoglobina.

Preguntas 11 y 12: Una mujer se presenta en un servicio de urgencias en estado de agitación, con un fuerte dolor abdominal y una gran debilidad en todos sus miembros. Los ensayos de laboratorio usuales son normales y no se encuentran anomalías específicas. La paciente es sedada con fenobarbital (un barbiturato) y mantenida en observación durante las horas siguientes. Su estado empeora rápidamente y en análisis adicionales se encuentra un nivel elevado de porfobilinógeno en su orina. Se le diagnostica una porfiria aguda intermitente. Las anomalías enzimáticas en esta enfermedad son un marcado aumento de la ALA sintasa y una reducción del 50% en la porfobilinógeno desaminasa.

11. La ácido aminolevulínico sintasa:
    A. requiere NAD para su actividad.
    B. está activada alostéricamente por el hemo.
    C. su síntesis es inhibida por esteroides.

D. se sintetiza en la mitocondria.
E. se puede inducir su síntesis con un gran número de fármacos.

12. Normalmente, el porfobilinógeno es un intermedio en la ruta de la biosíntesis del hemo. Hay muchos otros intermedios. El uroporfirinógeno III:
A. se sintetiza rápidamente a partir de porfobilinógeno en presencia de una cosintasa.
B. no contiene un anillo tetrapirrólico.
C. se forma a partir del coproporfirinógeno III por descarboxilación.
D. se convierte directamente en protoporfirinógeno IX.
E. su formación constituye la principal etapa de control en la síntesis del hemo.

Preguntas 13 y 14: Si una mujer con Rh negativo queda embarazada de un feto Rh positivo, desarrollará anticuerpos contra los factores Rh. Alrededor del tercer embarazo Rh positivo, los anticuerpos cruzarán la placenta y hemolizarán hematíes fetales. Puesto que los enzimas hepáticos del metabolismo de la bilirubina no están totalmente desarrollados en el recién nacido, al cabo de pocos días del nacimiento el bebé desarrollará ictericia, hepatoesplenomegalia, ascitis y edema. Si no recibe tratamiento, puede dañarse el sistema nervioso central.

13. La sustancia depositada en la piel y la esclerótica en la ictericia es:
A. biliverdina.
B. sólo bilirrubina no conjugada.
C. sólo bilirrubina directa.
D. tanto bilirrubina como bilirrubina diglucurónico.
E. hematina.

14. La bilirrubina conjugada:
A. se transporta en la sangre unida a albúmina sérica.
B. es deficitaria en el síndrome de Crigler- Najjar, una deficiencia de una UDP-glucuronosiltransferasa.
C. disminuye en el suero en la obstrucción del tracto biliar.
D. es la forma de bilirrubina que más aumenta en las enfermedades hepáticas.
E. es menos soluble en solución acuosa que la forma no conjugada.

Problemas

15. En las etapas iniciales de la deficiencia de hierro, tienen lugar cambios fisiológicos aunque no hay síntomas clínicos. El nivel y el porcentaje de saturación de la transferrina sérica son relativamente normales. A medida que la deficiencia de hierro progresa, disminuye el hierro en el suero y el nivel de transferrina sérica total aumenta, pero su porcentaje de saturación disminuye. ¿Cómo se mantiene el nivel de hierro en el suero en las etapas iniciales? ¿Cual es el objetivo del aumento de transferrina en las etapas tardías?

16. Los microorganismos necesitan hierro para su replicación y función. Los lactantes están protegidos contra las infecciones gastrointestinales a causa de la forma en que se maneja el hierro en la leche humana. En individuos con una sobrecarga de hierro, microorganismos que normalmente no son patógenos pueden volverse patógenos a causa de la disrupción de su forma normal de manejar el hierro. ¿Cual es el mecanismo de manejo del hierro que explica estos dos estados?.

RESPUESTAS

1. **B** Las ferredoxinas animales, conocidas también como proteínas sin hemo que contienen hierro, tienen dos átomos de hierro unidos a dos residuos cisteína y comparten dos iones sulfuro.
2. **A** La hemosiderina es un depósito amorfo de hierro alrededor de la ferritina cuando hay hierro en exceso.
3. **E** La internalización del complejo transferrina–receptor está mediada por un complejo Ca^{2+}–calmodulina–proteína quinasa C. Tras la internalización el hierro es liberado y la apotransferrina es reciclada hacia el plasma.
4 **A** El ascorbato facilita la reducción al estado ferroso y, por tanto, la disociación de ligandos y la absorción. B: Una cantidad sustancial de hierro entra en las células de la mucosa independientemente de las necesidades de éstas, pero se controla la cantidad transferida a los lechos de capilares. C: El hierro unido a la apoferritina queda atrapado en las células de la mucosa y no es transferido al huésped. D: el hierro debe disociarse de los ligandos para su absorción. Ésta es la razón de que el hierro de las espinacas no sea una buena fuente de hierro. E: La oxidación a Fe^{3+} está favorecida a pH elevados.
5 **D** B y D: En presencia de concentraciones de hierro bajas este mecanismo conlleva un aumento en la síntesis del receptor de transferrina y a una disminución de la síntesis de apoferritina. A: La elevada afinidad de muchas macromoléculas por el hierro impide una excreción eficiente. C: El nivel de transferrina aumenta durante la deficiencia de hierro para mejorar la absorción. E: La ferritina sérica es normalmente baja y a su vez disminuye.
6 **A** La porción orgánica del hemo proviene totalmente de glicina y succinil CoA; la cadena lateral del ácido propiónico proviene del succinato. D: El paso final de la síntesis del hemo es la inserción del ion ferroso.
7 **A** El plomo inhibe la ALA deshidratasa, lo que conduce a la acumulación de ALA. B-D: se inhibe la síntesis de porfobilinógeno y de los compuestos siguientes. Ciertamente el nivel del hemo no sería elevado, puesto que el plomo inhibe también a la ferroquelatasa. E: La bilirrubina es un producto de degradación del hemo, no un intermedio de su síntesis.
8 **D** Este enzima cataliza el paso final de la síntesis del hemo, la inserción del Fe^{2+}, y es sensible a los efectos de los metales pesados. A,B: Es un enzima de la síntesis. C: Esto describe una proteína ferrosulfurada. E: El último paso de la síntesis del hemo es un proceso mitocondrial.
9 **B** Las oxigenasas suelen utilizar O_2. A: El enzima tiene especificidad por el meteno situado entre los dos anillos que contienen los grupos vinilo (puente α-meteno). C y D: Los productos son biliverdina y CO; la medición de CO en la respiración se usa como índice de la degradación del hemo. E: El hierro es necesario para la actividad.
10 **A** La haptoglobina forma parte del mecanismo de recuperación para evitar la pérdida por la orina de hemo y hemoglobina por degradación intravascular de eritrocitos. B: Los niveles séricos de haptoglobina son bajos porque el complejo es captado por el sistema reticuloendotelial. C: Los residuos hemo de los dímeros unidos a haptoglobina son más susceptibles que el hemo

libre a la oxidación por la hemooxigenasa. D: El hemo y la hematina se unen a una β-globulina, mientras que la haptoglobina es una α-globulina. E: La desoxihemoglobina en condiciones fisiológicas no se disocia en dímeros.

11 **E** El enzima es inducido en respuesta a una necesidad así como por fármacos y metabolitos. Al tratar con fenobarbital a la paciente de porfiria aumentó su ALA sintasa ya previamente elevada. A: En el mecanismo interviene una base de Schiff y glicina, por tanto el coenzima es el piridoxal fosfato. B: El hemo inhibe alostéricamente y suprime la síntesis del enzima. C: Un producto de reducción de los esteroides catabólicos estimula la síntesis. D: El gen de este enzima se encuentra en el DNA nuclear.

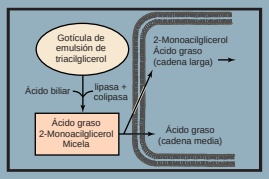
12 **A** En ausencia de cosintasa, el uropofirinógeno I se sintetiza lentamente. B: En este punto el anillo de tetrahidropirrol ya se ha formado. C,D: La descarboxilación va del uroporfirinógeno al coproporfirinógeno, que se convierte a continuación en protoporfirinógeno. E: La síntesis de ácido aminolevulínico es el paso limitante de velocidad.

13 **D** Se depositan tanto la bilirrubina conjugada (directa) como la no conjugada (indirecta). Provienen de la descomposición de los hematíes.

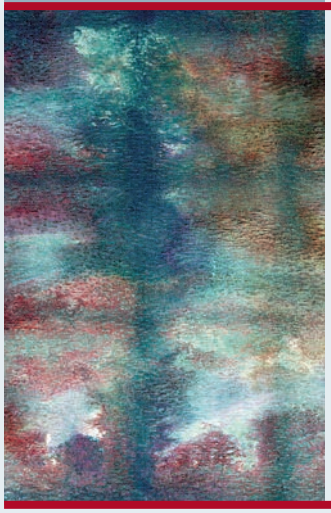
14 **B** La bilirrubina conjugada es el diglucurónido de bilirrubina. A: La bilirrubina no conjugada es transportada unida a la albúmina. C: El hígado conjuga bilirrubina pero si el conducto biliar está obstruído no será excretada. D: El hígado es responsable de la conjugación, que estaría impedida en caso de lesión hepática. E: El propósito de la conjugación es aumentar la solubilidad en agua.

15 En ausencia de hierro, las formas de almacenamiento de hierro en el hígado y en la médula ósea se consumirán para mantener el hierro del suero. La cantidad normal de ferritina sérica disminuye y la que hay es mayoritariamente apoferritina con poco hierro unido. En las etapas tardías, la transferrina aumenta en un intento de absorber más hierro del tracto gastrointestinal.

16 Normalmente hay muy poco hierro libre puesto que las proteínas que unen hierro no están saturadas por completo. En la leche, la proteína es la lactoferrina, que une hierro rápidamente. En el suero la proteína es la transferrina. Normalmente hay un exceso de capacidad de unir hierro, pero en una sobrecarga de hierro, la transferrina puede llegar a estar casi completamente saturada. Esto hace que hayan pequeñas cantidades de hierro libre disponibles.



25



DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LOS CONSTITUYENTES BÁSICOS DE LA NUTRICIÓN

Ulrich Hopfer

25.1 VISIÓN GENERAL 1082

Múltiples órganos gastrointestinales contribuyen a la digestión de los alimentos 1082

25.2 DIGESTIÓN: CONSIDERACIONES GENERALES 1084

Diferentes lugares para la digestión intestinal 1084
Los enzimas digestivos se secretan en forma de proenzimas 1085
La secreción está regulada por muchos secretagogos 1085

25.3 TRANSPORTE EPITELIAL 1088

El transporte de solutos puede ser transcelular o paracelular 1088
La absorción de NaCl tiene componentes activos y pasivos 1090
La secreción de NaCl depende de la Na^+/K^+–ATPasa contraluminal 1092
Los gradientes de concentración o los potenciales eléctricos impulsan el transporte de nutrientes 1095
Las células parietales gástricas secretan HCl 1096

25.4 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE PROTEÍNAS 1097

Las peptidasas aseguran una digestión eficiente de las proteínas 1097
Las pepsinas catalizan la digestión gástrica de proteínas 1097
Los zimógenos pancreáticos se activan en el intestino delgado 1098
Las peptidasas del borde en cepillo y citoplasmáticas digieren los péptidos pequeños 1099
Los aminoácidos y los dipéptidos se absorben mediante transporte facilitado por transportador 1099

25.5 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE GLÚCIDOS 1100

Los di- y polisacáridos requieren hidrólisis 1100
Los monosacáridos se absorben mediante transporte facilitado por transportador 1103

25.6 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS 1104

La digestión de lípidos ha de superar su solubilidad limitada en agua 1104
Los lípidos se digieren mediante lipasas gástricas y pancreáticas 1104
Las micelas de ácidos biliares solubilizan los lípidos durante la digestión 1105
La mayoría de los lípidos absorbidos se incorporan a los quilomicrones 1108

25.7 METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS BILIARES 1110

BIBLIOGRAFÍA 1112

PREGUNTAS 1113

RESPUESTAS 1114

APLICACIONES CLÍNICAS

25.1 La cloridorrea familiar produce alcalosis metabólica 1092
25.2 Fibrosis quística 1093
25.3 Diarreas por bacterias toxigénicas y terapia de reposición de electrolitos 1094
25.4 Aminoaciduria neutra: enfermedad de Hartnup 1100
25.5 Deficiencia de disacaridasa 1103
25.6 Intervenciones farmacológicas para evitar la absorción de grasas y la obesidad 1106
25.7 Cálculos de colesterol 1109
25.8 A-β-lipoproteinemia 1110

25.1 VISIÓN GENERAL

La secreción de fluidos digestivos y la digestión de los alimentos fueron algunos de los primeros mecanismos bioquímicos en investigarse al principio de la era de la ciencia moderna. En ella fueron hitos significativos el descubrimiento de la secreción de ácido clorhídrico por el estómago y de la hidrólisis enzimática de las proteínas y del almidón por el jugo gástrico y la saliva, respectivamente. El descubrimiento de la producción de HCl gástrico se remonta al médico americano William Beaumont (1785–1853). En 1822 trató a un paciente con una herida en el estómago. El paciente se recuperó de la herida pero conservó una fístula gástrica (abertura anormal a través de la piel). Beaumont aprovechó la oportunidad para estudiar y obtener jugo gástrico a tiempos diferentes durante y después de las comidas. Los análisis químicos revelaron, para sorpresa de químicos y biólogos, la presencia del ácido inorgánico HCl. Este descubrimiento estableció el principio de las secreciones especializadas en el tracto gastrointestinal elaboradas por glándulas especializadas.

Poco después se reconoció el principio de la degradación enzimática de los alimentos. Theodor Schwann, un anatomista y fisiólogo alemán (1810–1882), observó en 1836 la capacidad del jugo gástrico para degradar la albúmina en presencia de ácido diluido. Reconoció que había una nueva sustancia implicada en ello y acuñó para la misma la palabra pepsina, del griego *pepsis*, que significa digestión. Hoy en día pueden describirse con mucho detalle los procesos de secreción de fluidos digestivos, digestión de alimentos y absorción de nutrientes y electrolitos.

Los nutrientes básicos son las proteínas, glúcidos y grasas. Muchos tipos diferentes de alimentos pueden satisfacer las necesidades alimentarias del hombre, aun cuando difieran en las proporciones de proteínas, glúcidos y grasas, y en la proporción entre materiales digeribles y no digeribles. Los productos vegetales no manipulados son especialmente ricos en **material fibroso** que no puede ser digerido por los enzimas del cuerpo humano y tampoco es degradado fácilmente por las bacterias intestinales. Las fibras son en su mayor parte glúcidos tales como **celulosa** (β-1,4-glucano) o **pectinas** (mezclas de ácido poligalacturónico esterificado con metilo, poligalactosa y poliarabinosa). Actualmente las dietas con alto contenido en fibras gozan de cierta popularidad a causa del volumen que añaden a las heces y un supuesto papel preventivo del desarrollo del cáncer de colon.

La Tabla 25.1 describe las contribuciones medias de diferentes clases de alimentos a la dieta de los estadounidenses. La ingestión de alimentos por parte de cada individuo puede desviarse de modo sustancial de la media, ya que el consumo de alimentos depende principalmente de su asequibilidad y de los gustos del individuo. La utilización de una gran variedad de alimentos es posible gracias a la gran adaptabilidad y capacidad de reserva digestiva del tracto gastrointestinal.

El conocimiento de la naturaleza de las proteínas y glúcidos de la dieta es importante desde un punto de vista clínico. Ciertas proteínas y glúcidos, aun siendo buenos nutrientes para la mayoría de las personas, no pueden ser digeridos adecuadamente por algunas de ellas, con lo que se producen enfermedades gastrointestinales. La supresión del material perjudicial puede eliminar los problemas gastrointestinales de estos individuos. Algunos ejemplos de constituyentes de los alimentos que pueden provocar trastornos gastrointestinales son el **gluten**, una de las fracciones proteicas del trigo, y la **lactosa**, que es el disacárido de la leche.

Múltiples órganos gastrointestinales contribuyen a la digestión de los alimentos

La mayoría de los nutrientes ingeridos consisten en grandes polímeros que han de degradarse a monómeros antes de que puedan ser absorbidos y puestos a disposi-

TABLA 25.1 Contribución de los principales grupos de alimentos al suministro diario de nutrientes en los Estados Unidos

Tipo de nutriente	*Consumo diario total (g)*	*Productos lácteos excepto mantequilla (%)*	*Carne, aves, pescado (%)*	*Huevos (%)*	*Frutas, frutos secos, verduras (%)*	*Harina, cereales (%)*	*Azúcar, edulcorantes (%)*	*Grasas, aceites (%)*
Proteína	100	22	42	6	12	18	0	0
Glúcidos	381	7	0,1	0,1	19	36	37	0
Grasa	155	13	35	3	4	1	0	42

ción de todas las células del cuerpo. El proceso completo, desde la ingestión del alimento hasta la absorción de los nutrientes por la sangre, consiste en una secuencia complicada de pasos que, como mínimo, incluyen los siguientes (véase Figura 25.1):

1. Homogeneización mecánica del alimento y mezclado de los sólidos ingeridos con los fluidos secretados por las glándulas del tracto gastrointestinal.

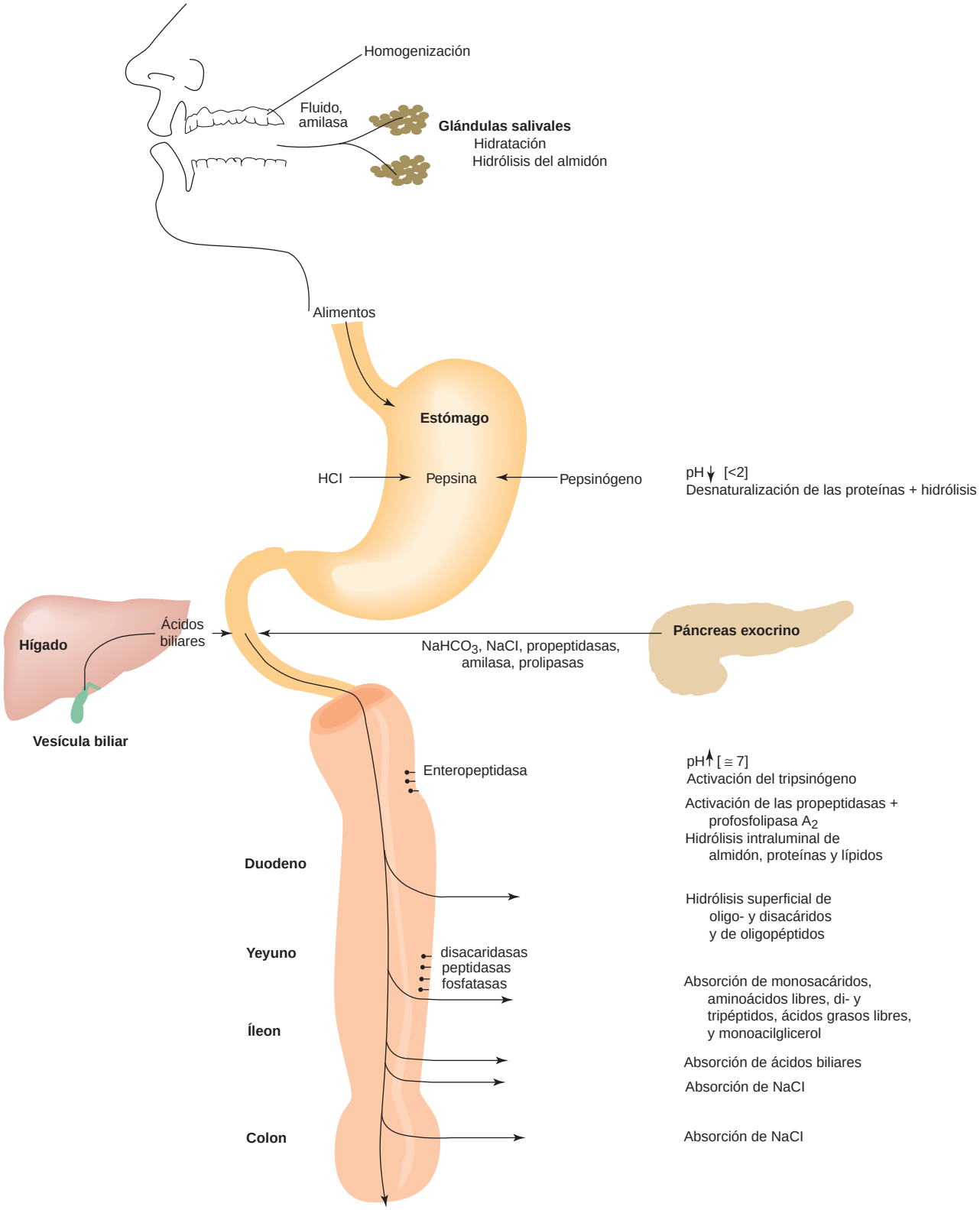


FIGURA 25.1
Órganos gastrointestinales y sus funciones.

2. Secreción de enzimas digestivos que hidrolizan macromoléculas a oligómeros, dímeros o monómeros.
3. Secreción de electrolitos, ácido o base, para proporcionar un ambiente adecuado para la digestión enzimática óptima.
4. Secreción de ácidos biliares como detergentes para solubilizar lípidos y facilitar su absorción.
5. Hidrólisis de los oligómeros y dímeros nutritivos por los enzimas de la superficie intestinal.
6. Transporte de las moléculas de nutrientes y de los electrolitos desde la luz intestinal a través de las células epiteliales hasta la sangre o linfa.

Para realizar estas diversas funciones el tracto gastrointestinal contiene glándulas especializadas y epitelios superficiales:

Órgano	*Función principal en la digestión y absorción*
Glándulas salivales	Elaboración de fluido y enzimas digestivos
Estómago	Elaboración de HCl y enzimas digestivos
Páncreas	Elaboración de $NaHCO_3$ y enzimas para la digestión intraluminal
Hígado	Elaboración de ácidos biliares
Vesícula biliar	Almacenamiento y concentración de la bilis
Intestino delgado	Digestión final de los alimentos, absorción de los nutrientes y electrolitos
Intestino grueso	Absorción de electrolitos

El **páncreas** y el **intestino delgado** son esenciales para la digestión y absorción de todos los nutrientes básicos. Afortunadamente, ambos órganos tienen gran capacidad de reserva. Por ejemplo, la mala digestión a causa de una insuficiencia pancreática sólo se convierte en un problema cuando la velocidad de secreción pancreática de enzimas digestivos disminuye por debajo de un décimo de la velocidad normal. La secreción del hígado (**bilis**) es importante para la absorción eficiente de lípidos, que depende de la presencia de ácidos biliares. Por el contrario, la digestión gástrica de alimentos no es esencial para la nutrición adecuada, y la pérdida de esta función puede compensarse por el páncreas y el intestino delgado. No obstante, la digestión gástrica normal aumenta en gran medida la suavidad y eficiencia del proceso digestivo total. El estómago ayuda a la digestión mediante su función de depósito, su capacidad de agitación y la iniciación de la hidrólisis de proteínas y lípidos, que, aunque pequeña, es importante para la estimulación de la secreción pancreática y de la vesícula biliar. Los péptidos, los aminoácidos y los ácidos grasos liberados en el estómago estimulan la liberación coordinada del jugo pancreático y de la bilis a la luz del intestino delgado, asegurando de este modo la digestión eficiente del alimento.

25.2 | DIGESTIÓN: CONSIDERACIONES GENERALES

Diferentes lugares para la digestión intestinal

La mayor parte de la degradación de los alimentos está catalizada por enzimas solubles y tiene lugar en la luz del estómago o del intestino delgado. Sin embargo, es el **páncreas**, y no el estómago, el principal órgano que sintetiza y secreta las grandes cantidades de enzimas necesarios para la digestión. En un adulto sano, la cantidad de enzimas secretados es como mínimo de 30 g de proteína al día. Los **enzimas pancreáticos**, junto con la bilis, se vierten a la luz de la segunda mitad (descendente) del duodeno, por lo que la mayor parte de la **digestión intraluminal** tiene lugar en posición distal respecto a este punto del intestino delgado. No obstante, los enzimas pancreáticos no pueden digerir completamente todos los nutrientes a formas que puedan ser absorbidas. Incluso después de un contacto exhaustivo con los enzimas pancreáticos, una parte sustancial de los glúcidos y aminoácidos están presentes en forma de oligómeros y dímeros, los cuales dependen para su digestión final de enzimas de la superficie luminal del intestino delgado o del interior de las células epiteliales que recubren la luz del intestino delgado (**enterocitos**).

Las membranas plasmáticas de los enterocitos dirigidas hacia la luz del intestino están engrosadas por una alineación regular de proyecciones, denominadas microvi-

lli, que les proporcionan una apariencia de cepillo (de ahí el nombre **borde en cepillo** para el polo luminal de los enterocitos). Esta membrana contiene en su superficie externa muchas **di- y oligosacaridasas, amino- y dipeptidasas**, así como **esterasas** (Tabla 25.2). Muchos de estos enzimas sobresalen hasta 100 Å en la luz intestinal, y están unidos a la membrana plasmática mediante un polipéptido de anclaje que en sí mismo no desempeña ningún papel en la actividad hidrolítica. Los sustratos de estos enzimas son los oligómeros y dímeros que resultan de la digestión pancreática de los alimentos. Los enzimas de la superficie son glucoproteínas que son relativamente estables a la digestión por las proteasas pancreáticas o al efecto de los detergentes.

Un tercer punto de digestión es el citoplasma de los enterocitos. La **digestión intracelular** tiene cierta importancia para la hidrólisis de di- y tripéptidos, los cuales pueden ser absorbidos por la membrana plasmática luminal.

Los enzimas digestivos se secretan en forma de proenzimas

Las glándulas salivales, la mucosa gástrica y el páncreas contienen células especializadas que sintetizan enzimas digestivos y los almacenan hasta el momento en que son necesarios durante una comida. Los enzimas son entonces liberados a la luz del tracto gastrointestinal (véase Figura 25.2). Esta secreción se denomina **exocrina** porque su dirección es hacia la luz. Las proteínas destinadas a secreción se sintetizan en los polisomas del retículo endoplasmático rugoso (véase p. 257 para la síntesis y glucosilación de proteínas de membrana y de secreción), y se transportan a través del complejo de Golgi hacia vesículas de almacenamiento en el citoplasma apical. Las vesículas de almacenamiento (**gránulos de zimógeno**) tienen un diámetro de ~1 μm y están limitadas por una membrana celular típica. La mayoría de los enzimas digestivos se producen y almacenan en forma de precursores inactivos denominados **proenzimas (zimógenos)** (véase p. 265). Cuando la célula recibe un estímulo apropiado para la secreción, los gránulos se trasladan hacia la membrana plasmática luminal, en donde su membrana se funde con la membrana plasmática, liberándose así su contenido en la luz (**exocitosis**). La activación de los proenzimas sólo tiene lugar después de haber sido liberados de las células.

La secreción está regulada por muchos secretagogos

La secreción de enzimas y de electrolitos está regulada y coordinada. Se requiere la elaboración de electrolitos y fluidos simultáneamente a la de enzimas para arrastrar fuera de la glándula y hacia la luz gastrointestinal los enzimas digestivos descargados. La regulación de la secreción tiene lugar mediante **secretagogos** que interaccionan con receptores en la superficie de las **células exocrinas** (Tabla 25.3). Neurotransmisores, hormonas, agentes farmacológicos y ciertas toxinas bacterianas pueden ser secretagogos. Células exocrinas diferentes, como las correspondientes a glándulas distintas, suelen poseer diferentes juegos de receptores. La unión de los secretagogos con los receptores desencadena una cadena de fenómenos de señalización que culmina

TABLA 25.2 Enzimas digestivos de la superficie del intestino delgado

Enzima (nombre común)	*Sustrato*
Maltasa	Maltosa
Sacarosa/isomaltasa	Sacarosa/α-dextrina límite
Glucoamilasa	Amilosa
Trehalasa	Trehalosa
β-Glucosidasa	Glucosilceramida
Lactasa	Lactosa
Endopeptidasa	Proteínas (corte a nivel de aminoácidos hidrofóbicos internos)
Aminopeptidasa A	Oligopéptidos con residuo NH_2 terminal ácido
Aminopeptidasa N	Oligopéptidos con residuo NH_2 terminal neutro
Dipeptidil aminopeptidasa IV	Oligopéptidos con X-Pro o X-Ala en el extremo amino
Leucina aminopeptidasa	Péptidos con aminoácido NH_2-terminal neutro
γ-Glutamiltransferasa	Glutatión + aminoácido
Enteropeptidasa (enteroquinasa)	Tripsinógeno
Fosfatasa alcalina	Fosfatos orgánicos

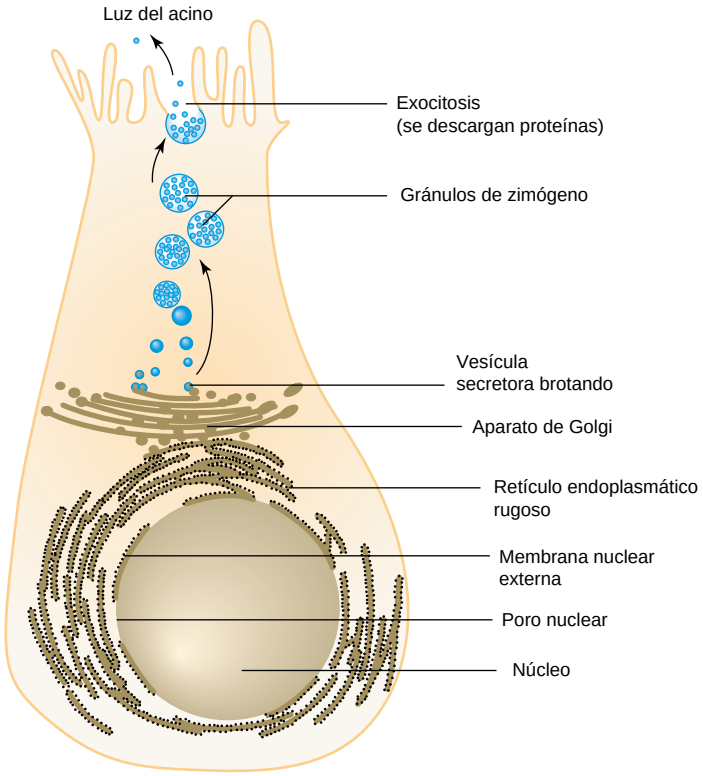


FIGURA 25.2
Secreción exocrina de los enzimas digestivos.
Adaptado con permiso de Jamieson, J. D. En: G. Weissmann y R. Claiborne (Eds.), Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology. *New York: HP Publishing, 1975. Dibujo de B. Tagawa.*

con la fusión de los gránulos de zimógeno con la membrana plasmática. Las dos rutas de señalización principales (Figura 25.3) son: (1) activación de la **fosfolipasa C** específica de fosfatidilinositol, con liberación de **inositol-1,4,5-trisfosfato** y **diacilglicerol** (véase p. 930). Éstos, a su vez, desencadenan respectivamente la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático al citosol y la activación de la proteína quinasa C; y (2) activación de la **adenilato** o **guanilato ciclasa**, que da lugar a niveles elevados de cAMP o cGMP, respectivamente (véase p. 925). La secreción se puede activar por ambas vías.

La **acetilcolina** (Figura 25.4) provoca la secreción de electrolitos y de los enzimas salivales, gástricos y pancreáticos. Es el neurotransmisor más importante para estimular la secreción que actúa desde el sistema nervioso central sobre las glándulas salivales y gástricas o mediante reflejos locales sobre las glándulas gástricas y el páncreas. El receptor de acetilcolina de las células exocrinas es del tipo muscarínico, es decir, puede ser bloqueado por la atropina (Figura 25.5). La mayor parte de la gente ha experimentado los efectos de la atropina, ya que los dentistas la utilizan para "secar" la boca mientras manipulan en la dentadura.

Ciertas aminas biógenas, la histamina y la **5-hidroxitriptamina (serotonina)**, son también secretagogos. La histamina (Figura 25.6) es un estimulador potente de la secreción de HCl. Interacciona con un receptor gástrico específico de histamina, conocido también como **receptor H_2** en la membrana plasmática contraluminal de las células parietales gástricas. La histamina es secretada normalmente por células reguladoras especializadas presentes en la pared del estómago (**células de tipo ente-**

TABLA 25.3 Secretagogos fisiológicos

Órgano	*Secreción*	*Secretagogo*
Glándula salival	NaCl, amilasa	Acetilcolina, (¿catecolaminas?)
Estómago	HCl, pepsinógeno	Acetilcolina, histamina, gastrina
Páncreas—acinos	NaCl, enzimas digestivos	Acetilcolina, colecistoquinina (secretina)
Páncreas—conducto	$NaHCO_3$, NaCl	Secretina
Intestino delgado	NaCl	Acetilcolina, serotonina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), guanilina

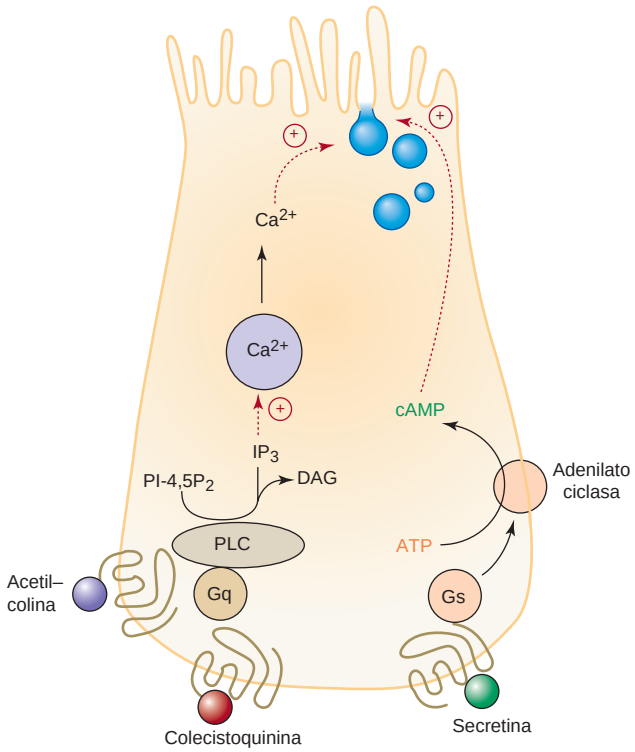


FIGURA 25.3
Regulación celular de la secreción exocrina en el páncreas.
Abreviaturas: PI-4,5P_2, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; DAG, diacilglicerol; IP_3, inositol-1,4,5-trifosfato; PLC, fosfolipasa C.
Adaptado de Gardner, J. D. Annu. Rev. Physiol. *41:63, 1979. Copyright © 1979 by Annual Reviews, Inc.*

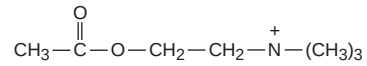


FIGURA 25.4
Acetilcolina.

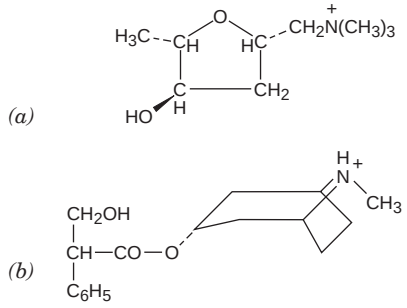


FIGURA 25.5
(*a*) L(+)-Muscarina y (*b*) atropina.

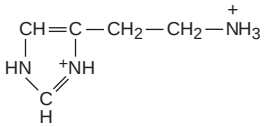


FIGURA 25.6
Histamina.

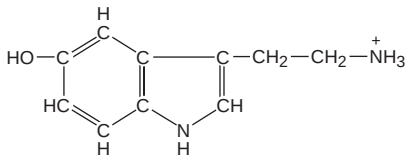


FIGURA 25.7
5-OH-triptamina (serotonina).

rocromafines, o **células ECL**). Los análogos de la histamina que actúan como antagonistas en el receptor H_2, se utilizan en medicina para disminuir la producción de HCl durante el tratamiento de las úlceras pépticas. La 5-hidroxitriptamina se halla presente en cantidades relativamente elevadas en el tracto gastrointestinal (Figura 25.7). Hace la función de neurotransmisor, pero además estimula directamente la secreción de NaCl por la mucosa del intestino delgado.

Una tercera clase de secretagogos está constituida por hormonas y neurotransmisores peptídicos (véase Tabla 25.4). Las células nerviosas del intestino son ricas en neurotransmisores peptídicos que estimulan la secreción de NaCl. Uno de los más potentes en los intestinos y el páncreas es el **péptido intestinal vasoactivo (VIP)**. El tracto gastrointestinal contiene muchas células epiteliales especializadas que producen aminas o péptidos biológicamente activos. Los péptidos se almacenan en gránulos, normalmente cercanos al polo contraluminal de estas células, y se liberan a la sangre. De ahí que estas células epiteliales se clasifiquen como **células endocrinas epiteliales**. Son especialmente importantes los péptidos gastrina, colecistoquinina (pancreozimina) y secretina. El péptido **guanilina**, se libera en parte a la luz y estimula la secreción del NaCl mediante la unión a un receptor del borde en cepillo que activa la guanilato ciclasa, y en consecuencia eleva los niveles de cGMP citosólicos.

La **gastrina** se presenta como un péptido de 34 aminoácidos (G-34) o de 17 residuos (G-17), obtenido a partir del extremo COOH de G-34. La porción funcional de la gastrina reside principalmente en los últimos cinco aminoácidos del extremo COOH. Así, la pentagastrina, un pentapéptido sintético que sólo contiene los cinco últimos aminoácidos, se puede utilizar para estimular específicamente la secreción gástrica de HCl y pepsina. Tanto la gastrina como la colecistoquinina poseen una interesante característica química, la de contener una **tirosina sulfatada**, que aumenta de manera considerable la potencia de ambas hormonas.

La **colecistoquinina** y la **pancreozimina** designan el mismo péptido. Los diferentes nombres aluden a las distintas funciones realizadas por el péptido y que fueron acuñadas con anterioridad a su purificación. El péptido estimula la contracción de la vesícula biliar (colecistoquinina) y también la secreción de enzimas pancreá-

TABLA 25.4 Neuropéptidos y hormonas intestinales secretores (humanos)

Péptido intestinal vasoactivo (VIP)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys
|
Asn-Leu-Ile-Ser-Asn-Leu-Tyr-Lys

Secretina

His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Gln
|
[c]NH_2-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Leu-Arg

Guanilina

Pro-Gly-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys

Gastrina G-34-II[a] G-17-II

[b]Glp-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln
|
[c]NH_2-Phe-Asp-Met-Trp-Gly-Tyr(SO_3H)-Ala-$(Glu)_5$-Leu-Trp-Pro-Gly

Colescistoquinina

Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Met-Ser-Ile-Val-Lys-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp-Pro
|
[c]NH_2-Phe-Asp-Met-Trp-Gly-Met-Tyr(SO_3H)-Asp-Arg-Asp-Ser-Ile-Arg-His-Ser

Fuente: Yanaihara, C. En: B. B. Rauner, G. M. Makhlouf y S. G. Schultz (Eds.), *Handbook of Physiology: Section 6: Alimentary Canal Vol II: Neural and Endocrine Biology.* Bethesda. MD: American Physiological Society, 1989, pp. 95–62.

[a]La gastrina I no está sulfatada

[b]Glp = ácido pirrolidino carboxílico, derivado del Glu mediante formación interna de amida.

[c]NH_2 = amida del aminoácido carboxi terminal.

ticos (pancreozimina). El péptido es secretado por las células epiteliales endocrinas del intestino delgado, especialmente en el duodeno, y esta secreción es estimulada por los aminoácidos y péptidos luminales, habitualmente procedentes de la proteólisis gástrica, por los ácidos grasos y por un pH ácido. Se cree que la colecistoquinina y la gastrina están relacionadas en un sentido evolutivo, ya que ambas comparten una secuencia de aminoácidos idéntica en el extremo COOH.

La **secretina**, un polipéptido de 27 aminoácidos, es secretada por otro tipo diferente de células endocrinas del intestino delgado. Su secreción es estimulada especialmente por un pH luminal inferior a 5. La actividad biológica principal de la secretina es la estimulación de la secreción del jugo pancreático rico en $NaHCO_3$. El $NaHCO_3$ pancreático es esencial para la neutralización del HCl gástrico en el duodeno. La secretina también favorece la liberación de enzimas pancreáticos al actuar de modo sinérgico con la colecistoquinina.

25.3 TRANSPORTE EPITELIAL

El transporte de solutos puede ser transcelular o paracelular

El movimiento de solutos a través de una capa de células epiteliales viene determinado por las propiedades de las células, especialmente de sus membranas plasmáticas, así como por los complejos intercelulares de las uniones de cementación (Figura 25.8). Las **uniones de cementación** se extienden en forma de cinturón alrededor del perímetro de cada célula epitelial existente conectando células vecinas. Por tanto, las uniones de cementación constituyen parte de la barrera entre los dos espacios extracelulares que se encuentran a cada lado del epitelio, esto es, la luz del tracto gastrointestinal a un lado y el espacio intercelular (intersticial) en el otro lado (sanguíneo o seroso). La unión de cementación marca también los límites entre la región **luminal** y la **contraluminal** de la **membrana plasmática** de las células epiteliales.

Se pueden distinguir dos rutas paralelas potenciales para el **transporte de solutos** a través de las capas de células epiteliales: a través de las células (**transcelular**) y a través de las uniones de cementación entre las células (**paracelular**) (Fi-

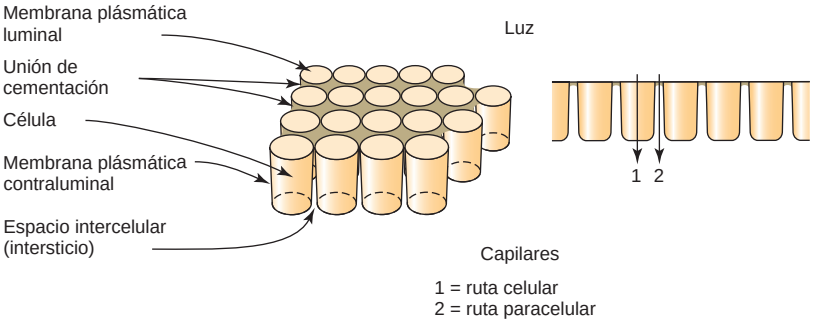


FIGURA 25.8
Rutas para el transporte a través de los epitelios.

gura 25.8). A su vez, la ruta transcelular consiste principalmente en dos barreras en serie formadas por las membranas plasmáticas luminal y contraluminal. Debido a esta combinación de barreras diferentes en paralelo (rutas celular y paracelular) y en serie (membranas plasmáticas luminal y contraluminal) se necesita información sobre las tres barreras, así como sobre su influencia mutua, para comprender las propiedades de transporte globales del epitelio.

Una de las funciones principales de las células epiteliales en el tracto gastrointestinal es el transporte activo de nutrientes, electrolitos y vitaminas. La base celular de este **movimiento vectorial de solutos** reside en las propiedades de diferentes transportadores de las regiones luminal y contraluminal de la membrana plasmática. Las células del intestino delgado constituyen un ejemplo de la diferenciación y especialización de los dos tipos de membrana. La membrana luminal y contraluminal difieren en aspectos morfológicos, composición enzimática, composición química y funciones de transporte (Tabla 25.5). La membrana luminal que está en contacto con los nutrientes en el quimo (masa semifluida de alimento parcialmente digerido) está especializada en la digestión terminal de nutrientes mediante enzimas hidrolíticos en su superficie externa, así como en la absorción de nutrientes a través de sistemas de transporte que llevan a cabo una absorción concentradora. Existen sistemas de transporte para los monosacáridos, aminoácidos, péptidos o electrolitos. Por el contrario, la membrana plasmática contraluminal, que está en contacto con el fluido intercelular, capilares y linfa, tiene propiedades parecidas a las de la membrana plasmática de la mayoría de las células. Posee receptores para la regulación hormonal o neuronal de funciones celulares, una Na^+,K^+-ATPasa para la eliminación de Na^+ de la célula y sistemas de transporte para la

TABLA 25.5 Diferencias características entre las membranas plasmáticas luminal y contraluminal de las células epiteliales del intestino delgado

Parámetro	*Luminal*	*Contraluminal*
Aspecto morfológico	Microvellosidades ordenadas (borde en cepillo)	Pocas microvellosidades
Enzimas	Di- y oligosacaridasas Aminopeptidasa Dipeptidasas γ-Glutamiltransferasa Fosfatasa alcalina Guanilato ciclasa	Na^+/K^+ ATPasa Adenilato ciclasa
Sistemas de transporte	Cotransporte Na^+–monosacárido (SGLT-1)	Transporte facilitado de monosacáridos (GLUT-2)
	Transporte facilitado de fructosa (GLUT-5)	Transporte facilitado de aminoácidos neutros
	Cotransporte Na^+–aminoácido neutro Cotransporte Na^+–ácido biliar (ASBT) Cotransporte H^+-péptido (PepT1)	

Abreviaturas: SGLT, transportador de sodio y glucosa; GLUT, transportador de glucosa; y ASBT, transportador apical de sodio y ácidos biliares.

entrada de los nutrientes necesarios para el mantenimiento celular. Además de ello, la membrana plasmática contraluminal contiene los sistemas de transporte necesarios para la salida de los nutrientes absorbidos desde la luz, de manera que el alimento digerido pueda estar a disposición de todas las células del cuerpo. Algunos de los sistemas de transporte de la membrana plasmática contraluminal pueden cubrir tanto la función de catalizar la salida cuando la concentración intracelular de nutrientes es elevada después de una comida, como la de facilitar su entrada cuando los niveles sanguíneos son más elevados que los del interior de la célula.

La absorción de NaCl tiene componentes activos y pasivos

El transporte de Na^+ juega un papel crucial no sólo para la absorción o secreción epitelial de NaCl, sino también en el suministro de energía para la captación de nutrientes. La **Na^+,K^+–ATPasa** proporciona el mecanismo dominante para la transducción de energía química, en forma de ATP, en energía osmótica a partir de un gradiente iónico de concentración (químico) o uno combinado de concentración y eléctrico (electroquímico) a través de la membrana plasmática. En las células epiteliales este enzima está localizado exclusivamente en la membrana plasmática contraluminal (Figura 25.9). La estequiometría de la reacción de intercambio

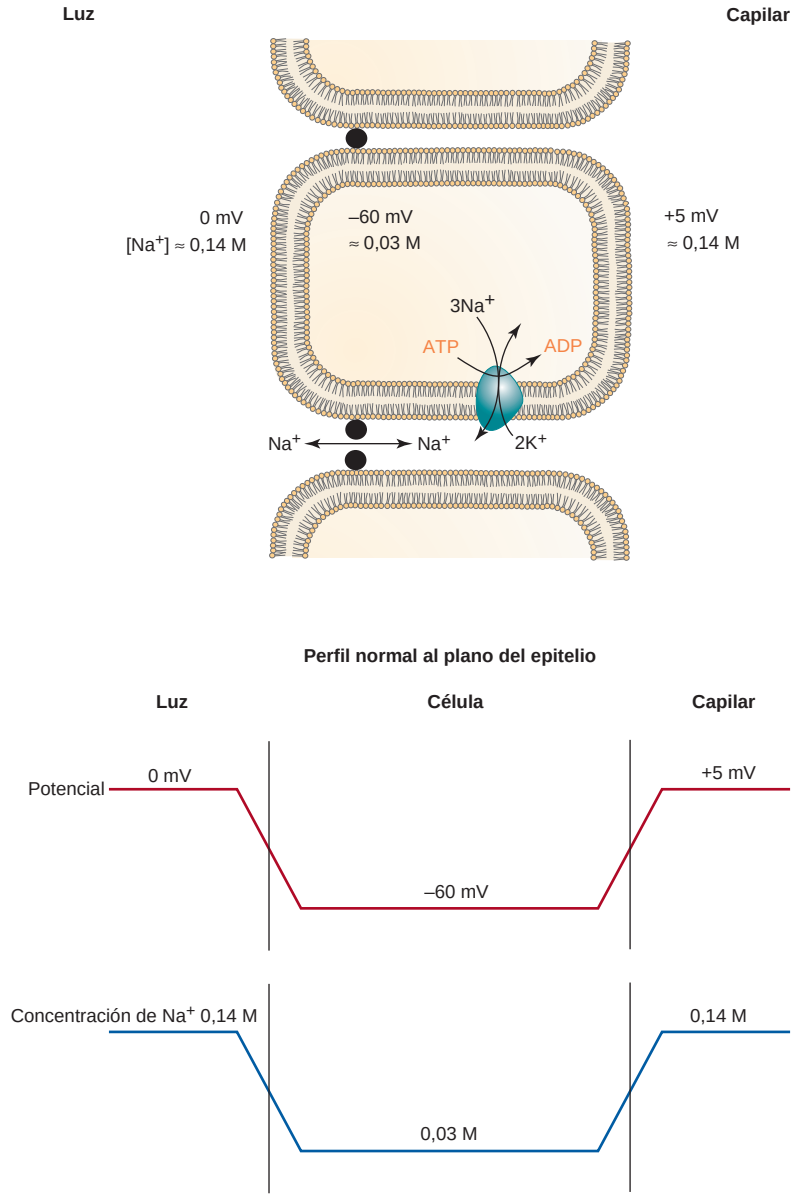


FIGURA 25.9
Concentraciones de Na^+ y potenciales eléctricos en los enterocitos.

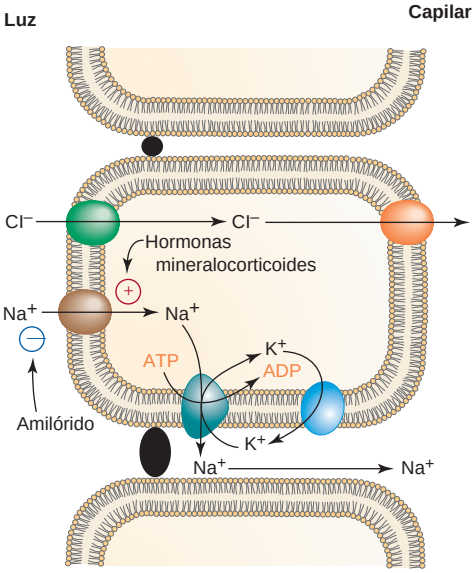


FIGURA 25.10
Modelo de absorción electrogénica de NaCl en el intestino grueso inferior. Los mecanismos de los transportadores de Na^+ están bien establecidos pero no se conoce la naturaleza del transportador de Cl^-.

de la Na^+,K^+–ATPasa es 1 mol de ATP acoplado al bombeo hacia el exterior de 3 moles de Na^+ y al bombeo simultáneo hacia el interior de 2 moles de K^+. La Na^+,K^+–ATPasa mantiene niveles de Na^+ bajos y de K^+ elevados en el citosol, y es responsable directa o indirectamente de un potencial eléctrico de unos −60 mV entre el citosol y la solución extracelular. La contribución directa se lleva a cabo por el movimiento de cargas cuando 3 iones Na^+ son reemplazados por 2 iones K^+. La contribución indirecta es mediante el gradiente de K^+, que se convierte en la fuerza dominante en el establecimiento del potencial eléctrico por el movimiento de K^+ a través de los **canales de K^+**.

Los **movimientos transepiteliales de NaCl** se producen por las acciones combinadas de la Na^+,K^+–ATPasa y los sistemas de transporte "pasivo" adicionales en la membrana plasmática que permiten la entrada de Na^+ o Cl^- al interior de la célula. La absorción de NaCl es el resultado de la entrada de Na^+ en las células a través de la membrana plasmática luminal y su expulsión por la Na^+,K^+– ATPasa a través de la membrana contraluminal. Las células epiteliales del tramo inferior del intestino grueso poseen un canal luminal de Na^+ **(canal epitelial de Na^+**, o, **ENaC)** que permite una entrada no acoplada de Na^+ a favor de su gradiente electroquímico (Figura 25.10). Este flujo de Na^+ es **electrogénico**, es decir, está asociado a una corriente eléctrica, y puede ser inhibido por la acción del fármaco diurético amilórido en concentraciones micromolares (Figura 25.11). Este sistema de transporte, y por consiguiente, la absorción de NaCl, están reguladas por hormonas mineralocorticoides de la corteza adrenal.

Las células epiteliales del intestino delgado poseen un sistema de transporte en la membrana del borde en cepillo, que cataliza un intercambio Na^+/H^+ eléctricamente neutro (**intercambiador Na^+/H^+, NHE,** siendo NH3 el isotipo predominante en el intestino) (Figura 25.12). El intercambio no se ve afectado por concentraciones bajas de amilórido, y no está regulado por mineralocorticoides. El intercambio Na^+/H^+ origina un gradiente de H^+ que origina a su vez la absorción de Cl^- a través de un **intercambiador Cl^-/HCO_3^-** situado en la membrana plasmática luminal, tal como se muestra en la Figura 25.12. El intercambiador Cl^-/HCO_3^- intestinal esta codificado por el gen "**regulado negativamente en el adenoma**" o ***DRA*** (véase Apli. Clín. 25.1). La necesidad de dos tipos de absorción de NaCl puede provenir de las diferentes funciones de los intestinos superior e inferior, que requieren regulación diferente. El intestino superior absorbe el grueso del NaCl de la dieta y de las secreciones de las glándulas exocrinas después de cada comida, mientras que el intestino inferior participa en la regulación fina de la retención del NaCl, según el equilibrio global de electrolitos del cuerpo.

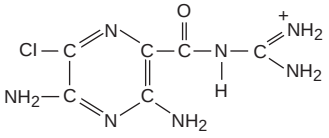
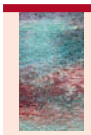


FIGURA 25.11
Amilórido.



APLICACIÓN CLÍNICA 25.1
La cloridorrea familiar produce alcalosis metabólica

La cloridorrea familiar está producida por mutaciones en el gen *DRA* humano (regulado negativamente en el adenoma). Los pacientes que padecen esta enfermedad tienen diarrea moderada, generan heces con un pH ácido, y por tanto sufren de alcalosis metabólica. El producto normal del gen *DRA* confiere una actividad de intercambio Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ en las células epiteliales del íleon inferior y el colon. Este transportador sirve para recuperar Cl^- de las heces y secretar bicarbonato para neutralizar la secreción normal de protones (vía el intercambio sodio/protón (NHE3)). La pérdida de actividad intercambiadora Cl^-/HCO_3^- explica la falta de absorción de Cl^- y el exceso de HCl en las heces. A su vez, la pérdida crónica de HCl en las heces es responsable de la alcalosis metabólica crónica. El exceso de electrolitos en las heces es el responsable de su mayor contenido de fluidos, es decir, de la diarrea, debido a efectos osmóticos.

Kere, J., Lohi, H. y Hoglund, P. Genetic disorders of membrane transport III. Congenital chloride diarrhea. *Am. J. Physiol.* 276:G7, 1999; y Melvin, J. E., Park, K., Richardson, L., Schultheis, P. J. y Shull, G. E. Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl^-/HCO_3^- exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na^+/H^+ exchanger. *J. Biol. Chem.* 274:22855, 1999.

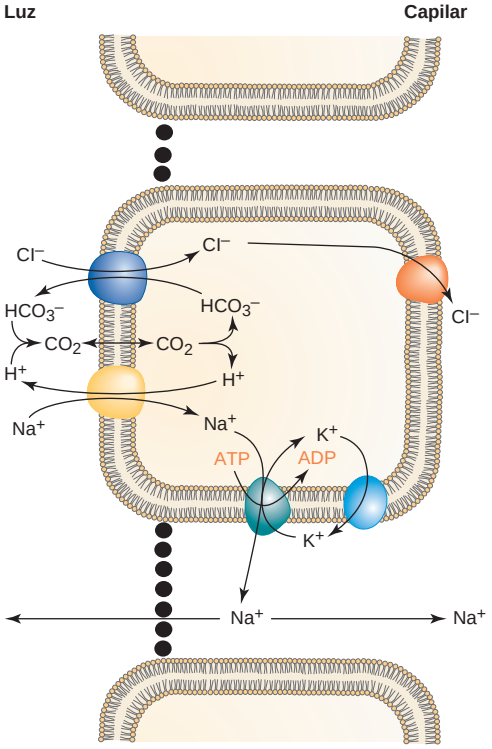


FIGURA 25.12
Modelo de absorción eléctricamente neutra del NaCl en el intestino delgado.

La secreción de NaCl depende de la Na^+/K^+–ATPasa contraluminal

Las células epiteliales de la mayor parte del tracto gastrointestinal poseen la capacidad de secreción de electrolitos y fluidos. Los iones secretados más importantes son el Na^+ y el Cl^-. Debido a las fuerzas osmóticas que produce cualquier soluto secretado, el agua los acompaña de forma pasiva. Así, la secreción de NaCl genera de forma secundaria la secreción de fluido. El fluido puede ser hipertónico o isotónico, según el tiempo de contacto del fluido secretado con el epitelio y la permeabilidad del tejido al agua. Cuanto más largo es el contacto y mayor la permeabilidad al agua, más cerca se está del equilibrio osmótico, esto es, mejor se consigue la isotonicidad. Las composiciones iónicas de las secreciones gastrointestinales se muestran en la Figura 25.13.

En la secreción de NaCl interviene la Na^+,K^+–ATPasa situada en la membrana plasmática contraluminal de las células epiteliales (Figura 25.14). El enzima está implicado en ello, ya que los glucósidos cardíacos, inhibidores de este enzima, anulan la secreción de sal. No obstante, la intervención de la Na^+,K^+–ATPasa no propor-

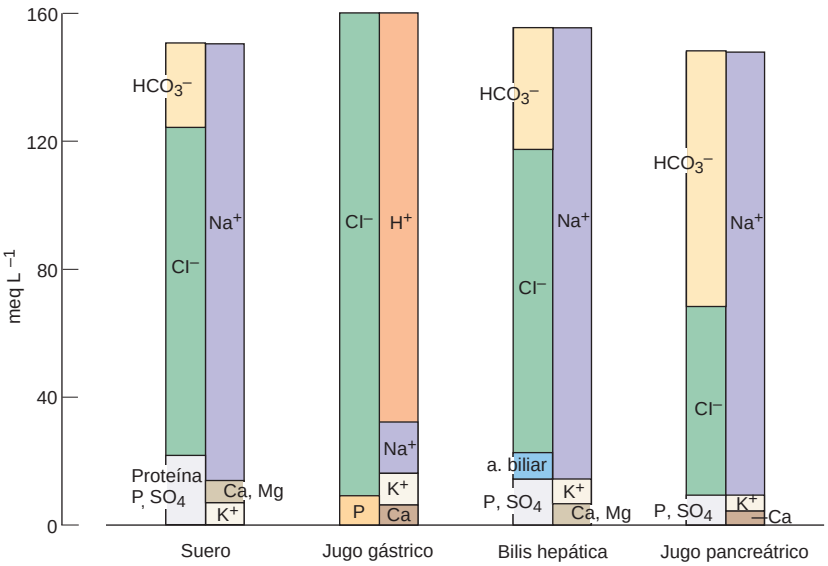


FIGURA 25.13
Composición iónica de las secreciones del tracto gastrointestinal.
Se incluye el suero como comparación. Obsérvese la elevada concentración de H^+ en el jugo gástrico (pH = 1) y la elevada concentración de HCO_3^- en el jugo pancreático. P, fosfato orgánico e inorgánico; SO_4 sulfato orgánico e inorgánico; Ca, calcio; Mg, magnesio; a. biliar, ácidos biliares.
Adaptado de Biological Handbooks. Blood & Other Body Fluids. *Federation of American Societies for Experimental Biology, 1961.*

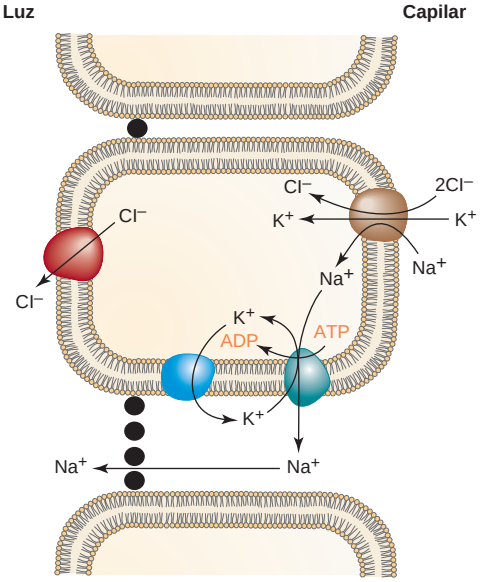


FIGURA 25.14
Modelo de secreción epitelial de NaCl.

ciona una explicación directa del movimiento de NaCl desde el lado capilar a la luz porque el enzima expulsa Na^+ desde la célula hacia el lado de los capilares. Así, el paso activo del transporte de Na^+ a través de una de las membranas plasmáticas sigue una dirección opuesta a la de los movimientos transepiteliales globales del NaCl. Esta paradoja se resuelve mediante el acoplamiento eléctrico de la secreción de Cl^- a través de la membrana plasmática luminal y los movimientos de Na^+ siguiendo la vía paracelular ilustrada en la Figura 25.14. La secreción de Cl^- depende de la captación acoplada de 2 iones Cl^- con Na^+ y K^+ a través de un cotransportador específico situado en la membrana plasmática contraluminal y a través de canales de Cl^- específicos situados en la membrana luminal (de forma predominante la **proteína transmembrana reguladora de la fibrosis quística** o proteína **CFTR**). El **cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCCl)** puede ser identificado mediante inhibidores específicos, como el diurético común **furosemida** (véase Figura 25.15); utiliza la energía del gradiente de Na^+ para acumular Cl^- dentro del citoplasma por encima de su concentración de equilibrio electroquímico. La apertura posterior de los canales luminales de Cl^- permite la salida de Cl^- junto con una carga negativa (véanse Aplis. Clíns. 25.2 y 25.3).

Las células acinares del páncreas secretan un fluido rico en Na^+ y Cl^- que proporciona un vehículo para el movimiento de los enzimas digestivos desde los acinos, donde son liberados, hasta la luz duodenal. El fluido se modifica en los conductos

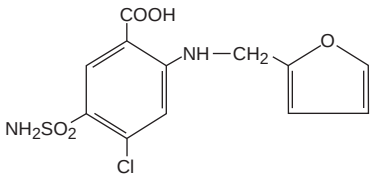
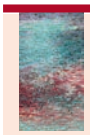


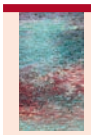
FIGURA 25.15
Furosemida.



APLICACIÓN CLÍNICA 25.2
Fibrosis quística

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que se debe a una mutación de la proteína transmembrana reguladora de la fibrosis quística (CFTR). Esta proteína contiene 1480 aminoácidos organizados en dos partes que atraviesan la membrana, cada una con seis regiones transmembrana, dos dominios de unión a ATP, y un dominio regulador que se fosforila por medio de una proteína quinasa dependiente de cAMP. Desde que se clonó el gen en 1989 se han descubierto cerca de 400 mutaciones de esta proteína.

La forma normal de la proteína es el principal canal de Cl^- que se encuentra en la membrana plasmática luminal de las células epiteliales de diversos tejidos. El canal se encuentra normalmente cerrado, pero se abre cuando la proteína quinasa A lo fosforila, proporcionando una secreción de Cl^- y de fluido reguladas. La mutación más común y que reviste una mayor gravedad se debe a la falta de una fenilalanina (ΔF508 CFTR), que impide que la proteína madure adecuadamente y alcance la membrana plasmática. Los individuos que heredan esta CFTR mutante de ambos progenitores presentan una falta de secreción de Cl^- y de fluido en aquellos tejidos que dependen de la CFTR para llevar a cabo esta función. A su vez, la imposibilidad de secretar fluido puede conducir a un deterioro del órgano causado por el bloqueo parcial o total de las vías internas de éste, por ejemplo, de los conductos pancreáticos, de la luz del intestino o de las vías respiratorias. (Véase Apli. Clín. 25.3 para la activación del canal de Cl^- de la CFTR.)



APLICACIÓN CLÍNICA 25.3

Diarreas por bacterias toxigénicas y terapia de reposición de electrolitos

En pacientes con cólera, una infección intestinal por *Vibrio cholerae*, se produce una gran secreción intestinal de electrolitos y líquidos (diarrea) que puede poner en peligro la vida del afectado. Ciertas cepas de *E. coli* también provocan diarrea (del viajante), que puede ser grave en lactantes. La condición secretora es el resultado de las enterotoxinas producidas por las bacterias. Se conoce bien a nivel bioquímico el mecanismo de acción de algunas de estas enterotoxinas. La toxina colérica activa la adenilato ciclasa, provocando la ADP-ribosilación de la proteína $G_{\alpha s}$, que estimula la ciclasa (véase p. 926). A su vez, el aumento en los niveles de cAMP activa la proteína quinasa A, que abre el canal luminal de Cl^- CFTR e inhibe el intercambiador de Na^+/H^+ mediante fosforilación de la proteína. El resultado neto es una gran secreción de NaCl. *Escherichia coli* produce una toxina termoestable que se une al receptor del péptido fisiológico "guanilina", es decir, la guanilil ciclasa de las células en cepillo. Cuando el receptor se encuentra ocupado por su lado luminal por la guanilina o por la toxina termoestable de *E. coli*, se activa el dominio guanilil ciclasa de la proteína, que se encuentra en el lado citosólico, aumentando los niveles de cGMP. El aumento en los niveles de cGMP ejerce el mismo efecto sobre la secreción de Cl^- que el aumento en los niveles de cAMP, exceptuando el hecho que en la fosforilación proteica interviene una proteína quinasa activada por cGMP.

El tratamiento oral moderno del cólera se aprovecha de la existencia de un cotransporte de Na^+–glucosa en el intestino, que no es regulado negativamente por el cAMP y permanece completamente activo en esta enfermedad. En este caso, la presencia de glucosa permite la captación de Na^+ para restaurar los niveles corporales de NaCl. La composición de la disolución para el tratamiento oral de los pacientes con cólera es: glucosa 110 mM, Na^+ 99 mM, Cl^- 74 mM, HCO_3^- 29 mM y K^+ 4 mM. Las principales ventajas de esta forma de terapia son su bajo coste y su facilidad de administración, cuando se la compara con la terapia intravenosa.

La composición de las bebidas deportivas para la recuperación de electrolitos está basada en el mismo principio, es decir la absorción más rápida de sodio en presencia de glucosa.

Carpenter, C. C. J. En: M. Field, J. S. Fordtran y S. G. Schultz (Eds.), *Secretory Diarrhea.* Bethesda, MD: American Physiological Society, 1980, p. 67.

por medio de la secreción adicional de **$NaHCO_3$** (Figura 25.16). La concentración de HCO_3^- en el jugo pancreático final puede alcanzar valores de hasta 120 mM.

La permeabilidad de la **unión de cementación** al H_2O, Na^+ u otros iones modifica los movimientos transepiteliales activos de solutos. Es necesaria una permeabilidad elevada para permitir que el Na^+ se equilibre entre las soluciones extracelulares de los compartimientos luminal e intercelular durante la secreción de NaCl o $NaHCO_3$. Diferentes regiones del tracto gastrointestinal difieren con respecto a los sistemas de transporte que determinan la entrada pasiva (véase más arriba canales de Na^+ sensibles al amilórido e intercambio de Na^+/H^+) y con respecto a las características de permeabilidad de la unión de cementación. La porción distal (colon) es mucho más impermeable, con el fin de evitar el paso de Na^+ desde la sangre a la luz de acuerdo con su función de captación del NaCl de la luz.

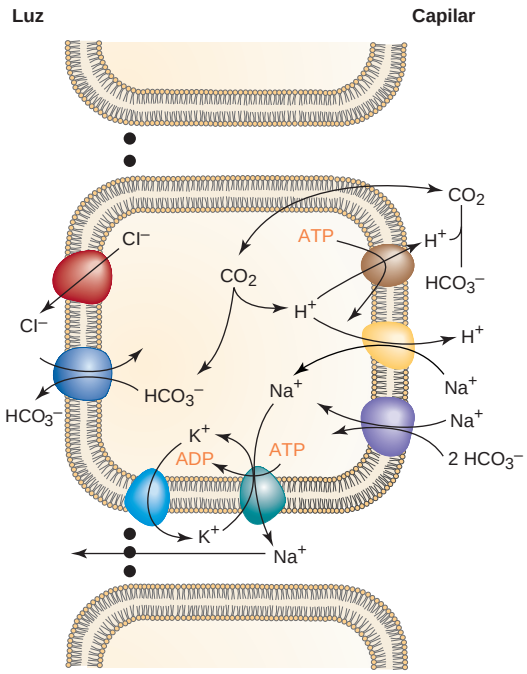


FIGURA 25.16
Modelo de secreción de $NaHCO_3$ por las células de los conductos pancreáticos. Obsérvese que existen tres mecanismos distintos para la entrada de bicarbonato en las células (o su equivalente secreción de protones) en la membrana plasmática contraluminal: (1) intercambio Na^+/H^+, (2) H^+–ATPasa, y (3) cotransporte $Na^+ - 2HCO_3^-$.

Los gradientes de concentración o los potenciales eléctricos impulsan el transporte de nutrientes

Muchos solutos son absorbidos a través del epitelio intestinal contra un gradiente de concentración. La energía para este transporte "activo" proviene directamente del gradiente de concentración de Na^+ o del potencial eléctrico a través de la membrana plasmática luminal, más que de la energía química de un cambio de enlace covalente, tal como la hidrólisis del ATP. El transporte de glucosa proporciona un ejemplo de transporte de solutos a contracorriente impulsado directamente por el gradiente electroquímico de Na^+ y sólo indirectamente por el ATP (Figura 25.17).

La **glucosa** es absorbida desde la luz intestinal hasta la sangre contra un gradiente de concentración. Este transporte vectorial es el resultado combinado de diversos mecanismos de membrana separados (Figura 25.18): (1) el transporte de Na^+ dependiente de ATP al exterior de la célula en el polo contraluminal que establece un gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática; (2) los canales de K^+ que convierten el gradiente de K^+ en un potencial de membrana; (3) los diferentes sistemas de transporte para la glucosa en las membranas plasmáticas luminal y contraluminal, y (4) el acoplamiento del transporte de Na^+ y glucosa a través de la membrana luminal.

El sistema de transporte de la membrana plasmática luminal facilita un movimiento estrechamente acoplado de Na^+ y D-glucosa o azúcares estructuralmente semejantes (**transportador de sodio–glucosa**, o, **SGLT**). El cotransportador intestinal de sodio–glucosa más común es el **SGLT1**, que acopla el movimiento de dos iones Na^+ con una molécula de glucosa. El sistema de transporte facilita el transporte de glucosa y de Na^+ de igual manera en ambas direcciones. No obstante, debido a la más elevada concentración de Na^+ en la luz y al potencial negativo dentro de la célula, la dirección observada es de la luz a la célula, incluso si la concentración celular de glucosa es mayor que la luminal. Dicho de otro modo, el movimiento de Na^+ a favor de la corriente apoya normalmente el transporte concentrador de glucosa. Se han observado *in vitro* proporciones de concentración superiores hasta 20 veces entre glucosa intra y extracelular en condiciones de salida bloqueada de la glucosa celular. En algunas situaciones, la captación de Na^+ a través de esta ruta es fisiológicamente más importante que la captación de glucosa (véase Apli. Clín. 25.3).

La membrana plasmática contraluminal contiene un miembro de la familia de **transportadores de glucosa (GLUT)**, que facilita la entrada y salida de la glucosa. El intestino contiene el transportador **GLUT2**, que acepta muchos monosacáridos, incluida la glucosa. La dirección del flujo neto viene determinada por el gradiente de concentración del azúcar. Los dos sistemas de transporte de glucosa en la membrana plasmática luminal y contraluminal, SGLT1 y GLUT2, respectivamente, comparten la glucosa como sustrato, pero por lo demás difieren de manera considerable en relación con la secuencia de aminoácidos, la estructura secundaria de la

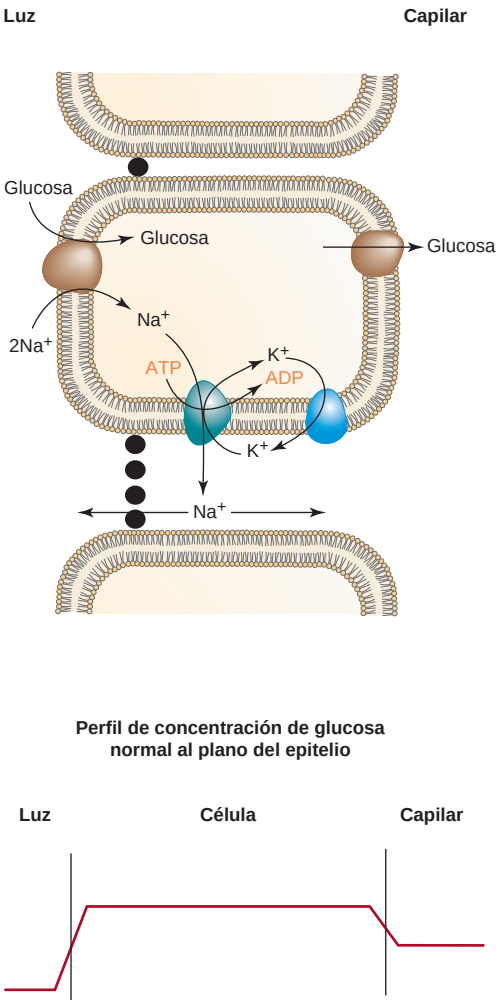


FIGURA 25.17
Modelo de absorción epitelial de glucosa.

$$2X\quad 3Na^+_{célula} + 2K^+_{intersticio} + ATP_{célula} \xrightarrow{Na^+,\,K^+\text{–ATPasa}} 3Na^+_{intersticio} + 2K^+_{célula} + ADP_{célula} + P_{célula}$$

$$4X\quad K^+_{célula} \rightleftharpoons K^+_{intersticio} \quad (\text{canal de } K^+)$$

$$3X\quad 2Na^+_{luz} + Glc_{luz} \rightleftharpoons 2Na^+_{célula} + Glc_{célula} \quad (\text{SGLT-1})$$

$$3X\quad Glc_{célula} \rightleftharpoons Glc_{intersticio} \quad (\text{GLUT-2})$$

$$6X\quad Na^+_{intersticio} \rightleftharpoons Na^+_{luz} \quad (\text{Unión de cementación})$$

$$\text{Suma}\quad 3Glc_{luz} + 2ATP_{célula} \longrightarrow 3Glc_{intersticio} + 2ADP_{célula} + 2P_{célula}$$

FIGURA 25.18
Transporte transepitelial de glucosa como reacciones de translocación a través de las membranas plasmáticas y de la unión de cementación.
El SGLT1 (transportador 1 de sodio glucosa) y el GLUT2 (transportador 2 de glucosa) son productos génicos específicos del intestino que llevan a cabo el cotransporte de Na^+–glucosa y el transporte facilitado de glucosa, respectivamente. Los números de la columna de la izquierda indican el recambio mínimo de las reacciones individuales necesario para equilibrar la reacción global.

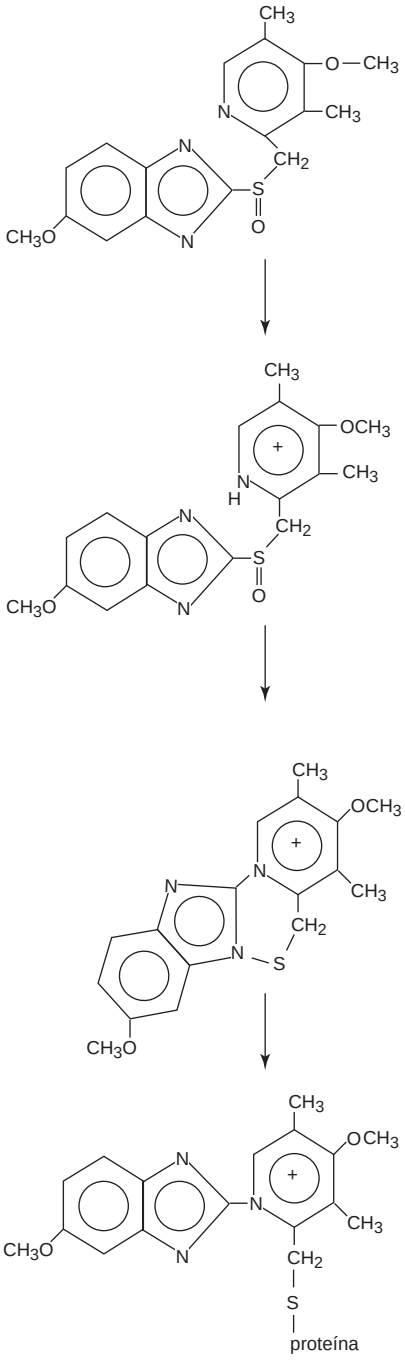


FIGURA 25.19
El omeprazol, un inhibidor de la H^+/K^+–ATPasa.
Este fármaco se acumula en un compartimiento ácido ($pK_a \sim 4$) y se convierte en una sulfenamida reactiva, que reacciona con grupos SH de las cisteínas.
Tomado de Sachs, G. En: L. R. Johnson (Ed.), Physiology of the Gastrointestinal Tract. *New York: Raven Press, 1994, p. 1133.*

proteína, el Na^+ como cosustrato, la especificidad hacia otros azúcares, la sensibilidad a inhibidores o la regulación biológica. Dado que tanto el SGLT como el GLUT no son inherentemente direccionales, el transporte de glucosa transepitelial "activo" se puede mantener en condiciones de estado estacionario solamente si la Na^+,K^+–ATPasa continúa expulsando Na^+ fuera de la célula. De este modo, el transporte activo de glucosa depende indirectamente de un suministro de ATP y de una Na^+,K^+–ATPasa activa.

La ventaja de un gradiente electroquímico de Na^+ que sirve como intermediario es que la Na^+,K^+–ATPasa puede impulsar el transporte de muchos nutrientes diferentes. El único requisito es la presencia de un sistema que catalice el cotransporte del nutriente con el Na^+.

Las células parietales gástricas secretan HCl

Las células parietales (oxínticas) de las glándulas gástricas son capaces de secretar HCl a la luz gástrica. Se han observado concentraciones luminales de H^+ de hasta 0,14 M (pH 0,8) (véase Figura 25.13). Dado que el pH del plasma es de 7,4, la célula parietal transporta protones contra un gradiente de concentración de $10^{6,6}$. La energía libre que se requiere para la **secreción de HCl** en estas condiciones es por lo menos de 9,1 kcal mol^{-1} de HCl (= 38 kJ mol^{-1} de HCl), tal como se calcula a partir de

$$\Delta G' = RT(2{,}3 \log 10^{6{,}6}) \qquad RT = 0{,}6 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ a } 37°C$$

En el mecanismo de la secreción activa de HCl interviene una **H^+/K^+ ATPasa** (o bomba de protones gástrica). Este enzima sólo se encuentra en la célula parietal y se localiza únicamente en la región luminal de la membrana plasmática. Acopla la hidrólisis de ATP a un intercambio obligatorio eléctricamente neutro de K^+ por H^+, secretando H^+ y captando K^+ hacia las células. La estequiometría parece ser de 1 mol de H^+ y K^+ transportados por cada mol de ATP:

$$ATP_{célula} + H^+_{célula} + K^+_{luz} \rightleftharpoons ADP_{célula} + P_{i,célula} + H^+_{luz} + K^+_{célula}$$

Dado que la H^+/K^+–ATPasa genera una solución muy ácida, los reactivos de proteínas que se activan por el ácido pueden convertirse en inhibidores específicos de este enzima. La Figura 25.19 muestra un ejemplo de un **inhibidor de la bomba de protones** usado para el tratamiento de las úlceras pépticas. En el estado estacionario, se elabora HCl por la H^+/K^+–ATPasa solamente si la membrana luminal es permeable al K^+ y al Cl^- y si la membrana plasmática contraluminal cataliza un intercambio de Cl^- por HCO_3^- (Figura 25.20). El intercambio de Cl^- por HCO_3^- es esencial para reabastecer la célula con Cl^- e impedir la acumulación de base dentro de la célula. Así, en condiciones de estado estacionario, la secreción de HCl a la luz gástrica está acoplada al movimiento de HCO_3^- al plasma.

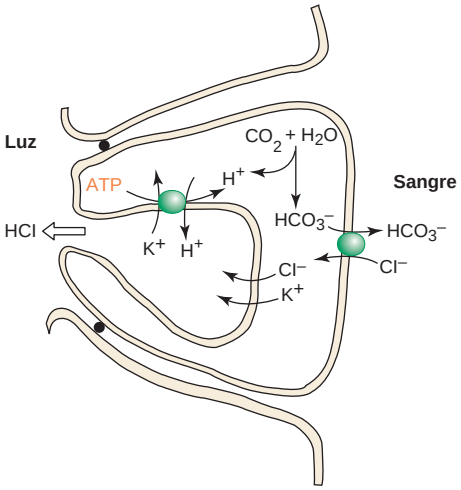


FIGURA 25.20
Modelo de secreción de ácido clorhídrico.

25.4 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE PROTEÍNAS

Las peptidasas aseguran la digestión eficiente de las proteínas

La cantidad diaria total de proteínas que se ha de digerir consta de 70–100 g de proteínas de la dieta y de 35–200 g de proteínas endógenas de los enzimas digestivos y de las células desechadas. La digestión y absorción de proteínas son procesos muy eficientes en los individuos sanos, ya que cada día sólo se pierden por las heces alrededor de 1–2 g de nitrógeno, lo que equivale a 6–12 g de proteína.

Con la excepción de un corto período después del nacimiento, los oligo- y polipéptidos no son absorbidos intactos en cantidades apreciables por el intestino. Las proteínas son hidrolizadas por peptidasas específicas para el enlace peptídico. Esta clase de enzimas se divide en **endopeptidasas** (proteasas), que atacan enlaces internos y liberan fragmentos peptídicos grandes, y **exopeptidasas**, que cortan un aminoácido cada vez desde el extremo COOH (**carboxipeptidasas**) o NH_2 (**aminopeptidasas**). Las endopeptidasas son importantes para una degradación inicial de polipéptidos largos en productos más pequeños, los cuales pueden ser atacados a continuación por las exopeptidasas con mayor eficiencia. Los productos finales son aminoácidos libres y di- y tripéptidos, que son absorbidos por las células epiteliales (Figura 25.21).

El proceso de la digestión de proteínas se puede dividir en una fase gástrica, una fase pancreática y una fase intestinal según el origen de las peptidasas.

Las pepsinas catalizan la digestión gástrica de proteínas

El jugo gástrico contiene HCl, un pH bajo, inferior a 2, y proteasas de la familia de la pepsina. El ácido sirve para matar los microorganismos y también para **desnaturalizar las proteínas**. La desnaturalización hace que las proteínas sean más susceptibles a la hidrólisis por proteasas. Las **pepsinas** son enzimas poco usuales ya que son estables frente a ácidos; de hecho, son activas a pH ácido pero no a pH neutro. El mecanismo catalítico, que es efectivo para la hidrólisis de péptidos a pH ácido, depende de dos grupos carboxílicos situados en el centro activo de los enzimas. La pepsina A, que es la proteasa gástrica principal, prefiere enlaces peptídicos formados por el grupo amino de aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr) (Tabla 25.6).

La pepsina activa se genera a partir del proenzima **pepsinógeno** por eliminación de 44 aminoácidos del extremo NH_2 (enzima porcino). La escisión del enlace peptídico entre los residuos 44 y 45 del pepsinógeno puede tener lugar, bien mediante una reacción intramolecular (**autoactivación**) por debajo de pH 5, bien mediante pepsina activa (autocatálisis). El péptido liberado del extremo NH_2 permanece

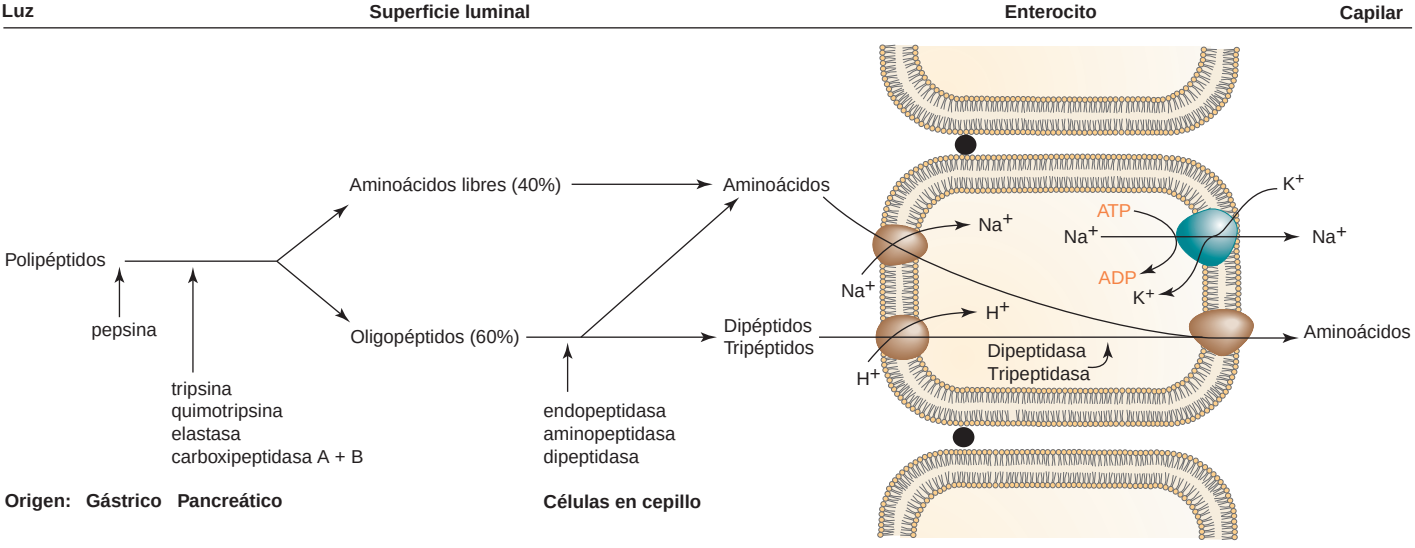


FIGURA 25.21
Digestión y absorción de proteínas.

TABLA 25.6 Peptidasas gástricas y pancreáticas

Enzima	*Proenzima*	*Activador*	*Punto de corte*	*R*
CARBOXIL PROTEASAS				
Pepsina A	Pepsinógeno A	Autoactivación, pepsina	—CO—NHCHCO—NHCHCO—	Tyr, Phe, Leu
SERINA PROTEASAS				
Tripsina	Tripsinógeno	Enteropeptidasa, tripsina	—CO—NHCHCO—NHCHCO—	Arg, Lys
Quimotripsina	Quimotripsinógeno	Tripsina	—CO—NHCHCO—NHCHCO—	Tyr, Trp, Phe, Met, Leu
Elastasa	Proelastasa	Tripsina	—CO—NHCHCO—NHCHCO—	Ala, Gly, Ser
ZINC PEPTIDASAS				
Carboxipeptidasa A	Procarboxipeptidasa A	Tripsina	—CO—NHCHCOO⁻	Val, Leu, Ile, Ala
Carboxipeptidasa B	Procarboxipeptidasa B	Tripsina	—CO—NHCHCOO⁻	Arg, Lys

unido a la pepsina y actúa como "inhibidor de la pepsina" por encima de pH 2. Esta inhibición desaparece mediante una caída del pH por debajo de 2 o por degradación posterior del péptido por la pepsina. Así, el pepsinógeno se convierte en pepsina mediante autoactivación y posterior autocatálisis a una velocidad exponencial.

Los principales productos de la acción de la pepsina son grandes fragmentos peptídicos y unos cuantos aminoácidos libres. La importancia de la digestión gástrica de proteínas no reside tanto en su contribución a la degradación de macromoléculas ingeridas como en la generación de péptidos y aminoácidos que actúan como estimulantes de la liberación de **colecistoquinina** en el duodeno. Los péptidos gástricos son, por tanto, instrumentos de la iniciación de la fase pancreática de la digestión de proteínas.

Los zimógenos pancreáticos se activan en el intestino delgado

El jugo pancreático es rico en **proenzimas** de endopeptidasas y de carboxipeptidasas (Figura 25.22), que se activan una vez que han alcanzado la luz del intestino

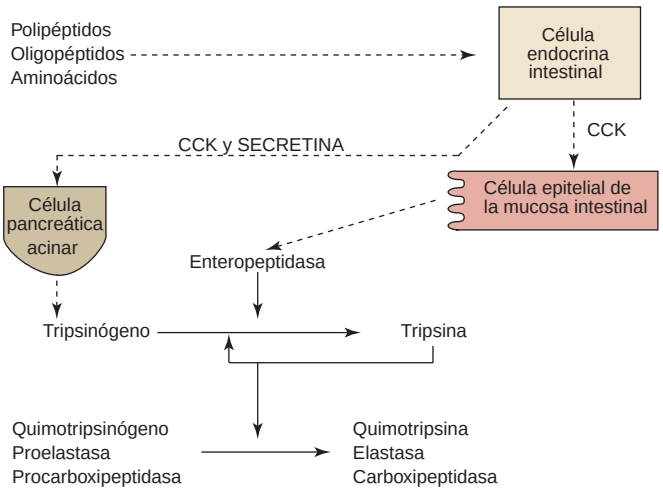


FIGURA 25.22
Secreción y activación de enzimas pancreáticos.
Abreviatura: CCK, colecistoquinina.
Reproducido con permiso de Freeman, H. J. y Kim, Y. S. Annu. Rev. Med. *29:102, 1978. Copyright © 1978 by Annual Reviews, Inc.*

delgado. La **enteropeptidasa** (denominada anteriormente **enteroquinasa**), una proteasa producida por células epiteliales del duodeno, activa el **tripsinógeno** pancreático a **tripsina** mediante escisión de un hexapéptido del extremo NH_2. A su vez, la tripsina activa de forma autocatalítica más tripsinógeno a tripsina, a la vez que actúa sobre los demás proenzimas, liberando así las endopeptidasas **quimotripsina** y **elastasa** y las **carboxipeptidasas A** y **B**. El jugo pancreático contiene normalmente un péptido de baja masa molecular que actúa como **inhibidor de la tripsina** y que neutraliza toda tripsina que se haya formado de manera prematura dentro de las células pancreáticas o de los conductos pancreáticos.

En la Tabla 25.6 se muestra la diferente especificidad de sustrato de la tripsina, quimotripsina y elastasa. Sólo son activas a pH neutro, y dependen del $NaHCO_3$ pancreático para que neutralice el HCl gástrico. El mecanismo de catálisis de los tres enzimas implica un **residuo de serina esencial** (véase p. 385), siendo similar al de las serina esterasas, como por ejemplo la acetilcolinesterasa. Los reactivos que interaccionan con la serina y la modifican inactivan las serina esterasas y peptidasas. Un ejemplo es el sumamente tóxico diisopropilfosfofluoridato, desarrollado inicialmente como arma química (es neurotóxico debido a su efecto inhibidor de la acetilcolina esterasa).

Los péptidos generados a partir de las proteínas ingeridas son degradados dentro de la luz del intestino delgado por las carboxipeptidasas A y B, que son **metaloenzimas** con $\mathbf{Zn^{2+}}$ y poseen un tipo diferente de mecanismo catalítico que las carboxi- o serina peptidasas. La acción combinada de las peptidasas pancreáticas tiene como resultado la formación de aminoácidos libres y péptidos pequeños de 2–8 residuos. A este nivel, los péptidos constituyen alrededor del 60% del nitrógeno amínico.

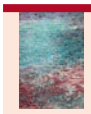
Las peptidasas del borde en cepillo y citoplasmáticas digieren los péptidos pequeños

Dado que el jugo pancreático no contiene actividad aminopeptidasa apreciable, la digestión final de los di- y oligopéptidos depende de enzimas del intestino delgado. La superficie luminal de las células epiteliales es especialmente rica en actividad endopeptidasa y aminopeptidasa pero también contiene dipeptidasas (Tabla 25.2). Esta digestión en la superficie celular produce aminoácidos libres y di- y tripéptidos, que son absorbidos vía **sistemas de transporte** específicos para **aminoácidos** o **péptidos**. Generalmente, los di- y tripéptidos transportados se hidrolizan dentro del citoplasma antes de abandonar la célula. Las dipeptidasas citoplasmáticas explican el hecho de que prácticamente sólo se encuentren aminoácidos libres en la sangre portal después de una comida. Previamente se había considerado la práctica ausencia de péptidos como prueba de que la digestión luminal de proteínas discurría totalmente hasta aminoácidos libres antes de que pudiese tener lugar la absorción. Sin embargo, en la actualidad está bien establecido que una gran parte del nitrógeno amínico de la dieta se absorbe en forma de péptidos pequeños, con posterior hidrólisis intracelular. Los di- y tripéptidos que contienen prolina e hidroxiprolina o aminoácidos no habituales, tales como la β-alanina en la carnosina (β-alanilhistidina) o la anserina (β-alanil 1-metilhistidina), se absorben sin que tenga lugar una hidrólisis intracelular debido a que no son buenos sustratos de las dipeptidasas citoplasmáticas intestinales. La β-alanina se encuentra en la carne de pollo.

Los aminoácidos y los dipéptidos se absorben mediante transporte facilitado por transportador

El intestino delgado posee una elevada capacidad para absorber aminoácidos libres y péptidos pequeños. La mayor parte de L-aminoácidos se pueden transportar a través del epitelio contra un gradiente de concentración, si bien la necesidad de este transporte concentrador *in vivo* no es obvia, ya que las concentraciones luminales son habitualmente superiores a los niveles plasmáticos de 0,1–0,2 mM. El transporte de aminoácidos y péptidos en el intestino delgado posee todas las características de un transporte facilitado por un transportador, tales como la discriminación entre aminoácidos D y L y la dependencia de energía y temperatura. Además, se sabe que en el ser humano se presentan defectos genéticos (Apli. Clín. 25.4).

Basándose en experimentos genéticos, de transporte y de clonación y expresión, pueden distinguirse en la membrana luminal al menos siete tipos diferentes de sistemas de transporte específicos de las células en cepillo para la captación de L-aminoácidos o péptidos pequeños (entre paréntesis el nombre del transportador



APLICACIÓN CLÍNICA 25.4

Aminoaciduria neutra: enfermedad de Hartnup

Las funciones de transporte, al igual que las funciones enzimáticas, están sujetas a modificación mediante mutaciones. Un ejemplo de defecto genético en el transporte epitelial de aminoácidos es la enfermedad de Hartnup, denominada así por el nombre de la familia en la que se reconoció por primera vez la entidad patológica resultante del defecto mencionado. La enfermedad se caracteriza por la incapacidad tanto de las células renales como de las del epitelio intestinal para absorber aminoácidos neutros a partir de la luz. En el riñón, en donde los aminoácidos plasmáticos alcanzan la luz del túbulo proximal a través del ultrafiltrado glomerular, la incapacidad para reabsorber aminoácidos se manifiesta por la excreción de éstos por la orina (aminoaciduria). El defecto intestinal tiene como consecuencia la malabsorción de aminoácidos de la dieta. Por tanto, los síntomas clínicos son principalmente los debidos a las deficiencias de aminoácidos esenciales y de nicotinamida. Las características parecidas a la pelagra (véase p. 1151) se explican por la deficiencia de triptófano, que es el precursor de la nicotinamida. Las investigaciones sobre los pacientes con la enfermedad de Hartnup pusieron de manifiesto la existencia de sistemas de transporte intestinales para di- y tripéptidos, diferentes a los de aminoácidos libres. La lesión genética no afecta al transporte de péptidos vía PepT1, que continúa siendo la vía de absorción de péptidos pequeños producto de la digestión de proteínas.

Silk, D. B. A. Disorders of nitrogen absorption. En: J. T. Harries (Ed.), *Clinics in Gastroenterology: Familial Inherited Abnormalities,* Vol. 11: London: Saunders, 1982, p. 47.

y los sustratos típicos): (1) para aminoácidos neutros con cadenas laterales polares o cortas (ASCT-1 para Ala, Thr, Ser); (2) para aminoácidos neutros con cadenas laterales aromáticas o hidrofóbicas (Phe, Tyr, Met, Val, Leu, Ile); (3) para iminoácidos (Pro, Hyp); (4) para β-aminoácidos (Beta/Taut para β-Ala, taurina); (5) para aminoácidos básicos y cistina (Lys, Arg, Cys-Cys); (6) para aminoácidos ácidos (EAAT-3 para Asp, Glu); y (7) para di- y tripéptidos (PepT1 para Gly-sarcosina).

Los mecanismos que concentran L-aminoácidos neutros parecen ser semejantes a los ya vistos para la D-glucosa (véase Figura 25.17). En la membrana luminal (células en cepillo) se han identificado sistemas de transporte dependientes de Na^+, y en la membrana plasmática contraluminal de las células del epitelio del intestino delgado existen sistemas de transporte independientes de Na^+. De modo parecido, al igual que sucede con el transporte activo de glucosa, la energía para el transporte concentrador de aminoácidos proviene directamente del gradiente electroquímico de Na^+ y sólo indirectamente del ATP. Los aminoácidos no se modifican químicamente durante su transporte a través de la membrana, aunque pueden ser metabolizados dentro del compartimiento citoplasmático. El modo en que se impulsa el transporte de los demás aminoácidos en las células en cepillo es más complejo. Por ejemplo, el EAAT-3 facilita el cotransporte de aminoácidos con 2 iones Na^+ y el transporte en dirección contraria de un ion K^+.

Los dipéptidos neutros son cotransportados con un H^+ y, por consiguiente, se ven impulsados a través de esta membrana por el gradiente electroquímico de protones. No obstante, debido al intercambio de Na^+/H^+, el gradiente de H^+ es similar al gradiente de Na^+ establecido por la Na^+/K^+-ATPasa. El transportador de dipéptidos acepta también antibióticos β-lactámicos (aminopenicilinas), siendo importante en el proceso de absorción de antibióticos de este tipo administrados por vía oral.

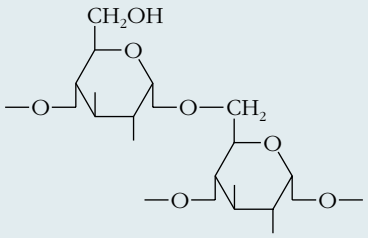
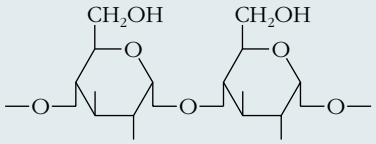
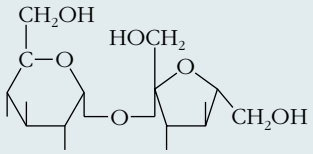
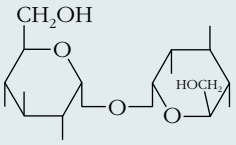
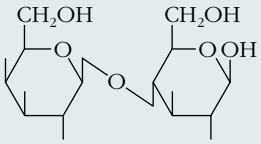
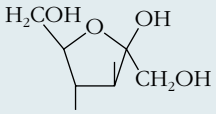
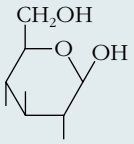
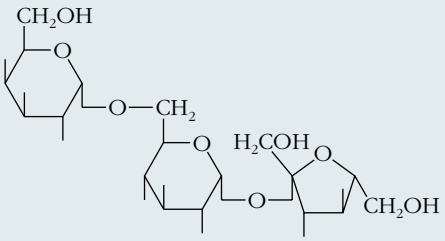
25.5 | DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE GLÚCIDOS

Los di- y polisacáridos requieren hidrólisis

Los glúcidos de la dieta proporcionan una parte importante de las necesidades calóricas diarias. Consisten en mono-, di- y polisacáridos (Tabla 25.7). Los principales en las dietas occidentales son la **sacarosa** (azúcar de mesa), almidón y lactosa. Los monosacáridos se absorben directamente. Los disacáridos precisan de los enzimas de la superficie del intestino delgado para hidrolizarse a monosacáridos, mientras que los polisacáridos dependen de la amilasa pancreática y de los enzimas de la superficie para su degradación (Figura 25.23).

El **almidón** es un nutriente principal. Es un polisacárido vegetal con una masa molecular de más de 100 kDa. Consiste en una mezcla de cadenas lineales de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α-1,4 (**amilosa**) y cadenas ramificadas con puntos de ramificación formados por enlaces α-1,6 (**amilopectina**). La proporción de enlaces glucosídicos 1,4- a 1,6- es de alrededor de 20:1. El **glucógeno** es un polisacárido animal semejante en estructura a la amilopectina. Los dos compuestos difieren en el número de puntos de ramificación, que son más frecuentes en el glucógeno.

TABLA 25.7 Glúcidos de la dieta

Glúcido	*Fuente típica*		*Estructura*
Amilopectina	Patatas, arroz, maíz, pan	α-Glc(1 → 4)$_n$Glc con ramificaciones α-Glc(1 → 6)	
Amilosa	Patatas, arroz, maíz, pan	α-Glc(1 → 4)$_n$ Glc	
Sacarosa	Azúcar de mesa, pasteles	α-Glc(1 → 2)β-Fru	
Trehalosa	Setas jóvenes	α-Glc(1 → 1)α-Glc	
Lactosa	Leche, productos lácteos	β-Gal(1 → 4)Glc	
Fructosa	Fruta, miel	Fru	
Glucosa	Fruta, miel, uva	Glc	
Rafinosa	Semillas de leguminosas	α-Gal(1 → 6)α-Glc (1 → 2)β-Fru	

El almidón hidratado y el glucógeno son atacados por la endosacaridasa **α-amilasa**, presente en la saliva y en el jugo pancreático (Figura 25.24). La hidratación de los polisacáridos se produce durante la cocción y es esencial para la digestión eficiente. La amilasa es específica para los enlaces glucosídicos α-1,4; los enlaces α-1,6 no son atacados, como tampoco lo son los enlaces α-1,4 de las unidades de glucosa en las que se encuentran los puntos de ramificación. La amilasa pancreática se secreta en gran exceso con respecto a la ingestión de almidón, y es más importante que el enzima de la saliva desde el punto de vista de la digestión. Los productos de

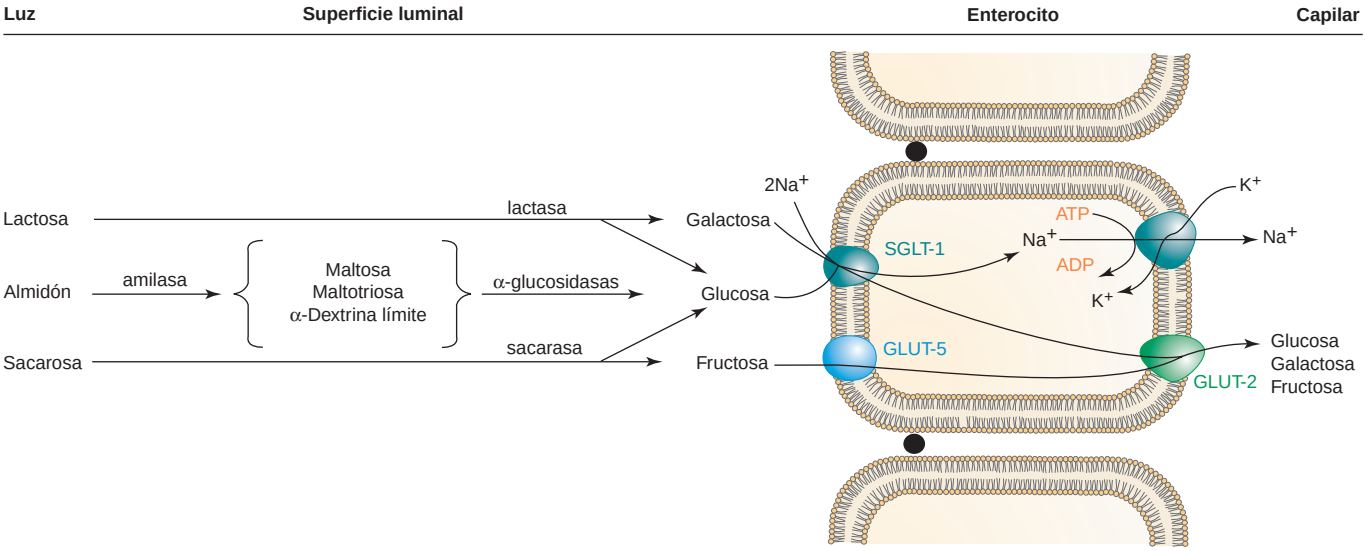


FIGURA 25.23
Digestión y absorción de glúcidos.

la digestión por la α-amilasa son principalmente el disacárido **maltosa**, el trisacárido **maltotriosa**, y las denominadas ***α*-dextrinas límite**, que contienen por término medio ocho unidades de glucosa con uno o más enlaces glucosídicos α-1,6.

La hidrólisis final de los di- y oligosacáridos a monosacáridos es llevada a cabo por los enzimas de la superficie de las células epiteliales del intestino delgado (Tabla 25.8). Las oligosacaridasas superficiales son exoenzimas que separan un monosacárido cada vez a partir del extremo no reductor. La capacidad de las ***α*-glucosidasas** es normalmente mucho mayor que la necesaria para completar la digestión del almidón. De manera similar, existe un exceso de capacidad de hidrólisis de sacarosa en relación con la ingesta de la dieta. Por el contrario, en el ser humano, la ***β*-galactosidasa (lactasa)** puede ser limitante de la velocidad de hidrólisis y utilización de la lactosa, que es el glúcido principal de la leche (véase Apli. Clín. 25.5).

Los di-, oligo- y polisacáridos que no son hidrolizados por la α-amilasa o por los enzimas de la superficie del intestino no se pueden absorber; por tanto, alcanzan el tracto final del intestino, que a partir del íleon inferior contiene bacterias. Las bacterias pueden utilizar muchos de los glúcidos restantes, puesto que poseen muchos más tipos de sacaridasas que el ser humano. Los monosacáridos liberados como consecuencia de la acción de los **enzimas bacterianos** son metabolizados preferentemente de forma anaeróbica por las propias bacterias, dando lugar a productos de degradación tales como ácidos grasos de cadena corta, lactato, gas hidrógeno (H_2), metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2). En exceso, estos compuestos pueden producir secreción de fluidos, aumento de la motilidad intestinal y calambres, ya sea debido al aumento de la presión osmótica intraluminal y la distensión del intestino, o a un efecto irritante directo de los productos de degradación bacterianos sobre la mucosa intestinal.

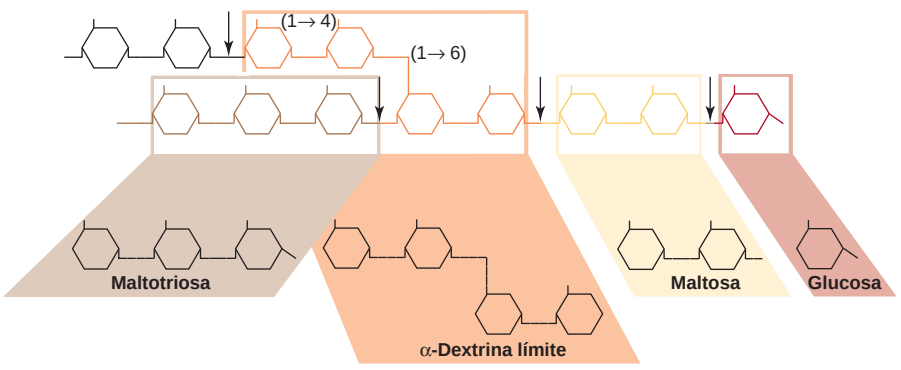


FIGURA 25.24
Digestión de la amilopectina por la α-amilasa salival y pancreática.

TABLA 25.8 Sacaridasas de la superficie de la membrana del intestino delgado

Enzima	*Especificidad*	*Sustrato natural*	*Producto*
exo-1, 4-α-Glucosidasa (glucoamilasa)	α-(1 → 4)Glucosa	Amilosa	Glucosa
Oligo-1, 6-glucosidasa (isomaltasa)	α-(1 → 6)Glucosa	Isomaltosa, α-dextrina	Glucosa
α-Glucosidasa (maltasa)	α-(1 → 4)Glucosa	Maltosa, maltotriosa	Glucosa
Sacarosa-α-glucosidasa (sacarasa)	α-Glucosa	Sacarosa	Glucosa fructosa
α,α-Trehalasa	α-(1 → 1)Glucosa	Trehalosa	Glucosa
β-Glucosidasa	β-Glucosa	Glucosilceramida	Glucosa, ceramida
β-Galactosidasa (lactasa)	β-Galactosa	Lactosa	Glucosa, galactosa

El consabido problema de la flatulencia después de la ingestión de semillas de leguminosas (alubias, guisantes, soja) es producido por oligosacáridos que no pueden ser hidrolizados por los enzimas intestinales humanos. Las semillas contienen sacarosa modificada a la que se han unido una o más unidades de galactosa. Los enlaces glucosídicos de la galactosa tienen la configuración α, que sólo puede ser escindida por enzimas bacterianos. El azúcar más sencillo de esta familia es la **rafinosa** (véase Tabla 25.7). La **trehalosa**, un disacárido que se encuentra en las setas jóvenes, requiere una disacaridasa especial, la trehalasa.

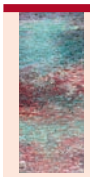
Los monosacáridos se absorben mediante transporte facilitado por transportador

Los monosacáridos mayoritarios que se producen en la digestión de di- y polisacáridos son la **D-glucosa**, **D-galactosa** y **D-fructosa**. La absorción de estos monosacáridos, así como la de otros monosacáridos minoritarios, son procesos facilitados por transportadores que muestran características de especificidad de sustrato, estereoespecificidad, cinética de saturación e inhibición por inhibidores específicos.

Se conocen al menos dos tipos de sistemas de transporte que catalizan la captación de monosacáridos desde la luz intestinal a la célula: (1) un sistema de **cotransporte Na^+-monosacárido** (**SGLT**) que existe probablemente en forma de tetrámero de péptidos de 75 kDa, con elevada especificidad para D-glucosa y D-galactosa y que cataliza la absorción "activa" de azúcares y (2) un **sistema de transporte de monosacáridos** con especificidad para la D-fructosa que es del tipo de **difusión facilitada** y que es **independiente del Na^+ (GLUT5)**. Además, en la membrana plasmática contraluminal se encuentra un sistema de **transporte de monosacáridos independiente del Na^+ (GLUT2)** que acepta los tres monosacáridos. El GLUT2 se localiza también en el hígado y en el riñón, y existen otros miembros de la familia GLUT de transportadores en todas las células. Todos los transportadores GLUT llevan a cabo el flujo desacoplado de D-glucosa a favor de su gradiente de concentración. El GLUT2 presente en el intestino, hígado y riñón, transporta la D-glucosa hacia el exterior de la célula y hacia la sangre, en condiciones fisiológicas, mientras que en otros tejidos el GLUT1 (eritrocitos y cerebro) o el transportador sensible a la insulina, el GLUT4 (en tejido muscular y adiposo) se encuentran principalmente implicados en la captación de D-glucosa. En la Tabla 25.9 se comparan las propiedades del transportador

TABLA 25.9 Características de los sistemas de transporte de glucosa en las membranas plasmáticas de los enterocitos

Característica	*Luminal*	*Contraluminal*
Nombre	SGLT-1	GLUT-2
Masa molecular de la subunidad (kDa)	75	57
Efecto del Na^+	Cotransporte con Na^+	Ninguno
Buenos sustratos	D-Glc, D-Gal, α-metil-D-Glc	D-Glc, D-Gal, D-Man, 2-desoxi-D-Glc



APLICACIÓN CLÍNICA 25.5
Deficiencia de disacaridasa

Las carencias de disacaridasa intestinal se dan de forma relativamente frecuente en el ser humano. La carencia se puede presentar en un solo enzima o en varios enzimas por diversas razones (defecto genético, declive fisiológico con la edad o como resultado de "lesiones" de la mucosa). De entre las disacaridasas, la lactasa es el enzima que presenta más comúnmente una deficiencia absoluta o relativa, manifestada en intolerancia a la leche. Las consecuencias de la incapacidad de hidrolizar lactosa en el intestino delgado superior son la incapacidad de absorber lactosa y la fermentación bacteriana de la lactosa ingerida en el intestino delgado inferior. La fermentación bacteriana produce gas (distensión del intestino, flatulencia) y solutos osmóticamente activos que drenan agua hacia la luz del intestino (diarrea). La lactosa del yogur ya ha sido parcialmente hidrolizada durante la fermentación que tiene lugar durante su producción. Así, los individuos con deficiencia de lactasa pueden a menudo tolerar el yogur más fácilmente que los productos lácteos sin fermentar. La lactasa se ha comercializado para realizar un tratamiento previo de la leche que dé lugar a la hidrólisis de la lactosa.

Buller, H. A. y Grant, R. G. Lactose intolerance. *Annu. Rev. Med.* 41:141, 1990.

intestinal SGLT1 y del GLUT2, mientras que su papel en la absorción transepitelial de la glucosa se muestra en la Figura 25.23.

25.6 | DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS

La digestión de lípidos ha de superar su solubilidad limitada en agua

Un humano adulto ingiere unos 60–150 g de lípidos diarios. Los **triacilgliceroles** constituyen más del 90% de la grasa de la dieta. El resto está formado por fosfolípidos, colesterol, ésteres del colesterol y ácidos grasos libres. Además de ello, en la luz del intestino delgado se secretan 1–2 g de colesterol y 7–22 g de fosfatidilcolina (lecitina) como constituyentes de la bilis.

Los lípidos se definen por su buena solubilidad en disolventes orgánicos y por su escasa o nula solubilidad en soluciones acuosas. La poca hidrosolubilidad presenta problemas para la digestión, ya que los sustratos no son fácilmente accesibles a los enzimas digestivos de la fase acuosa. Además, incluso si los lípidos ingeridos se hidrolizan en constituyentes sencillos, los productos tienden a agregarse en complejos mayores que establecen poco contacto con la superficie celular, por lo que no son fácilmente absorbibles. Estos problemas se pueden superar mediante (1) aumento del área interfacial entre las fases acuosa y lipídica y (2) "solubilización" de los lípidos con **detergentes**. Así, los cambios en el estado físico de los lípidos están estrechamente relacionados con los cambios químicos que se producen durante la digestión y la absorción.

Pueden distinguirse al menos cinco fases diferentes (Figura 25.25): (1) hidrólisis de triacilgliceroles a ácidos grasos libres y monoacilgliceroles; (2) solubilización de los lípidos por detergentes (ácidos biliares) y transporte desde la luz intestinal hacia la superficie celular; (3) captación de ácidos grasos libres y monoacilgliceroles al interior de la célula de la mucosa y resíntesis a triacilgliceroles; (4) empaquetamiento de los triacilgliceroles recién sintetizados en glóbulos lipídicos especiales denominados quilomicrones; y (5) exocitosis de los quilomicrones desde las células de la mucosa a la linfa.

Los lípidos se digieren mediante lipasas gástricas y pancreáticas

La hidrólisis de los triacilgliceroles se inicia en el estómago mediante las **lipasas lingual y gástrica**. La digestión gástrica puede suponer hastas un 30% de la hidrólisis total de los triacilgliceroles. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis es lenta, ya que los triacilgliceroles ingeridos forman una fase lipídica separada con una interfase agua–lípido limitada. La lipasa se adsorbe en esta interfase y convierte los triacilgliceroles en ácidos grasos y diacilgliceroles (Figura 25.26). La importancia de la hidrólisis inicial radica en el hecho de que algunos de los triacilgliceroles inmiscibles con el agua se convierten en productos que poseen al mismo tiempo grupos polares y apolares. Estos productos tensoactivos se adsorben espontáneamente a las interfases agua–lípido, y confieren una superficie hidrofílica a las gotículas de lípido, proporcionando por

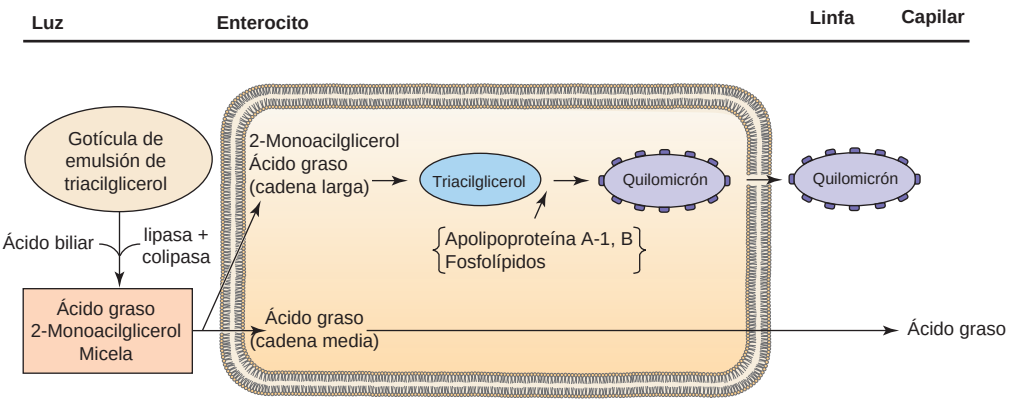


FIGURA 25.25
Digestión y absorción de lípidos.

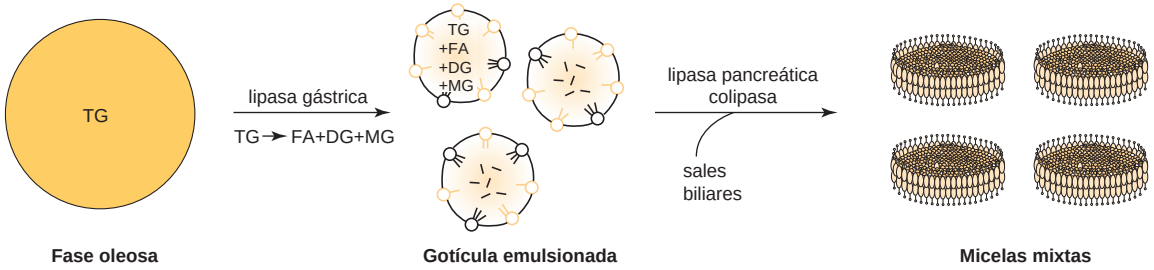


FIGURA 25.26
Cambios en el estado físico durante la digestión de triacilgliceroles.
Abreviaturas: TG, triacilglicerol; DG, diacilglicerol; MG, monoacilglicerol; AG, ácido graso.

tanto una interfase estable adicional con el ambiente acuoso. A volumen constante de la fase lipídica, cualquier incremento del área interfacial produce dispersión de la fase lipídica en gotículas más pequeñas (**emulsificación**), proporcionando así un mayor número de sitios donde se pueden adsorber las moléculas de lipasa.

El enzima principal de la hidrólisis de los triacilgliceroles es la **lipasa pancreática** (Figura 25.27). Este enzima es específico para ésteres en la posición ***α*** del glicerol, y prefiere ácidos grasos de cadena larga (de más de 10 átomos de carbono). La hidrólisis por el enzima pancreático también tiene lugar en la interfase agua–lípido de las gotículas de la emulsión. Los productos son **ácidos grasos libres** y ***β*-monoacilgliceroles**. La forma purificada del enzima es fuertemente inhibida por los ácidos biliares normalmente presentes en el intestino delgado durante la digestión de lípidos. El problema de la inhibición se supera mediante la **colipasa**, una proteína pequeña (12 kDa), que se une tanto a la interfase agua–lípido como a la lipasa, anclándose y activando el enzima. Es secretada por el páncreas en forma de procolipasa y depende de la eliminación tríptica del decapéptido NH_2-terminal para la expresión máxima de su actividad. La Apli. Clín. 25.6 describe dos estrategias comerciales para reducir la absorción de lípidos como medio de disminuir la obesidad.

El jugo pancreático contiene también otra **esterasa de lípidos inespecífica**, que actúa sobre los ésteres del colesterol, monoacilgliceroles u otros ésteres lipídicos, tales como ésteres de la vitamina A con ácidos carboxílicos. A diferencia de la triacilglicerol lipasa, esta lípido esterasa precisa de los ácidos biliares para su actividad.

Los fosfolípidos se hidrolizan mediante fosfolipasas específicas. Las secreciones pancreáticas son especialmente ricas en la **profosfolipasa A_2** (Figura 25.28). Al igual que otros proenzimas pancreáticos, también éste es activado por la tripsina. La fosfolipasa A_2 precisa ácidos biliares para su actividad.

Las micelas de ácidos biliares solubilizan los lípidos durante la digestión

Los **ácidos biliares** son detergentes biológicos que se sintetizan en el hígado y se secretan con la bilis en el duodeno, en forma de conjugados de la glicina o la taurina (Figura 25.29). A valores de pH fisiológicos son aniones y tienen propiedades detergentes. Los términos ácidos biliares y **sales biliares** se utilizan con frecuencia de manera intercambiable. A valores de pH superiores a su p*K* y a concentraciones superiores a 2–5 mM los ácidos biliares (véase Tabla 25.10) forman reversiblemente agregados. Estos agregados se denominan **micelas** (véase p. 502), y la mínima concentración necesaria para la formación de micelas es la **concentración micelar crítica** (Figura 25.30). Las moléculas de ácidos biliares de la micela están en equilibrio con las moléculas libres en solución. Así, las micelas son, a diferencia de los lípidos emulsionados, estructuras en equilibrio con tamaños bien definidos y mucho menores que las gotículas de emulsión. El tamaño de las micelas oscila generalmente entre 4 y 60 nm, en función de la concentración de ácidos biliares y de la proporción de ácidos biliares a lípidos.

En las micelas los ácidos biliares tienen sus partes hidrofóbicas sustraídas del contacto con el agua, mientras que los grupos hidrofílicos permanecen expuestos al agua. La región hidrofóbica de los ácidos biliares está formada por una superficie del sistema de anillos fusionados, mientras que el ion carboxilato o sulfonato y los grupos hidroxilo del otro lado del sistema anular son hidrofílicos. Las principales fuerzas impulsoras para la formación de micelas son las de la separación de los gru-

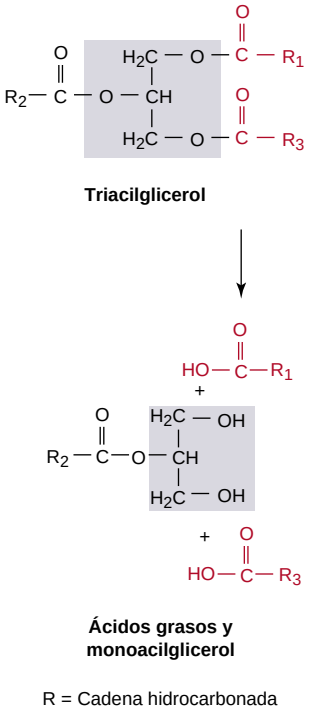
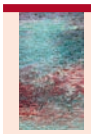


FIGURA 25.27
Mecanismo de acción de la lipasa.



APLICACIÓN CLÍNICA 25.6

Intervenciones farmacológicas para evitar la absorción de grasas y la obesidad

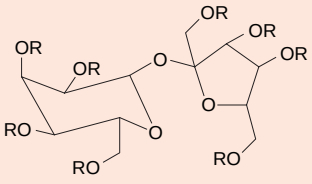
La obesidad constituye un gran problema en la sociedad moderna occidental al ser en general muy abundantes los alimentos. Por tanto, el interés en la reducción de peso es generalizado. Dos estrategias comerciales recientes explotan el conocimiento de la absorción intestinal de lípidos con este propósito.

Olestra® es un lípido comercial producido por esterificación de ácidos grasos naturales con sacarosa en vez de glicerol (Figura (*a*)). De seis a ocho ácidos grasos están unidos covalentemente a la sacarosa. Estos compuestos hexa-, hepta- u octa-acil sacarosa tienen un sabor igual a los lípidos naturales; sin embargo, no pueden ser hidrolizados a constituyentes absorbibles y por tanto se excretan sin modificación.

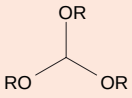
La lipasa pancreática es el principal enzima que degrada los triacilgliceroles de la dieta a ácidos grasos absorbibles y glicerol. El Orlistat® (Figura (*b*)) es un potente inhibidor de la lipasa pancreática y por tanto de la digestión y absorción de lípidos. La ingestión de Orlistat® bloquea la absorción de lípidos y provoca la excreción de lípidos, con la ventaja adicional de un tránsito intestinal más lento debido a la retroalimentación debida a los lípidos que llegan al intestino delgado terminal y al colon. El Orlistat® es un análogo no hidrolizable de un triacilglicerol.

Olestra es una marca registrada de Proctor and Gamble y Orlistat de Roche, Basel, Suiza.

(*a*)

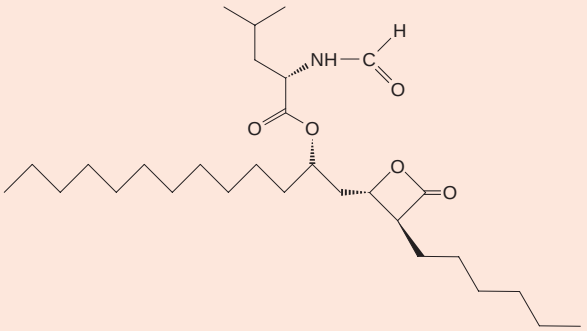


Olestra = octa-acil sacarosa



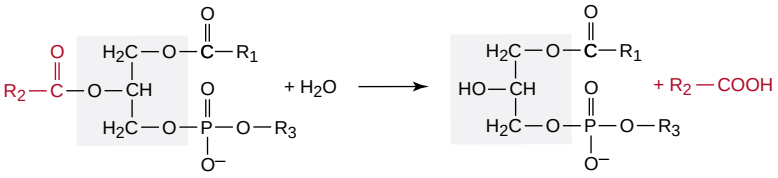
triacilglicerol

(*b*)



Orlistat®

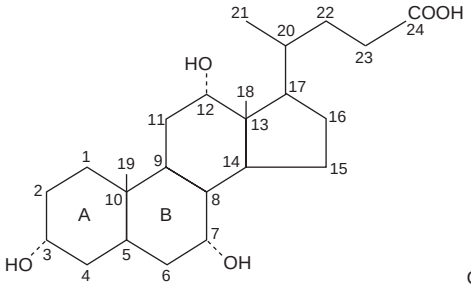
Thompson, A. B. R., et al. En: A. B. Christophe y S. DeVriese, (Eds), *Fat Digestion and Absorption.* Champaign, IL: AOCS Press, 2000, p. 383; y Golay, A. En: A. B. Christophe y S. DeVriese, (Eds.), *Fat Digestion and Absorption.* Champaign, IL: AOCS Press, 2000, p. 420.



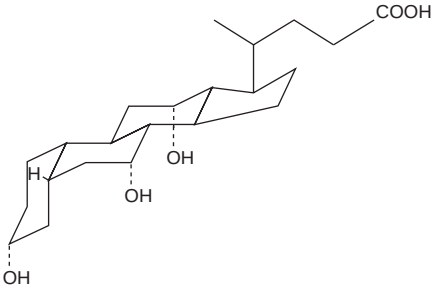
Fosfátido **Lisofosfátido y ácido graso**

R_1, R_2 = cadena hidrocarbonada
R_3 = alcohol (colina, serina, etc.)

FIGURA 25.28
Mecanismo de acción de la fosfolipasa A_2.



Ácido cólico

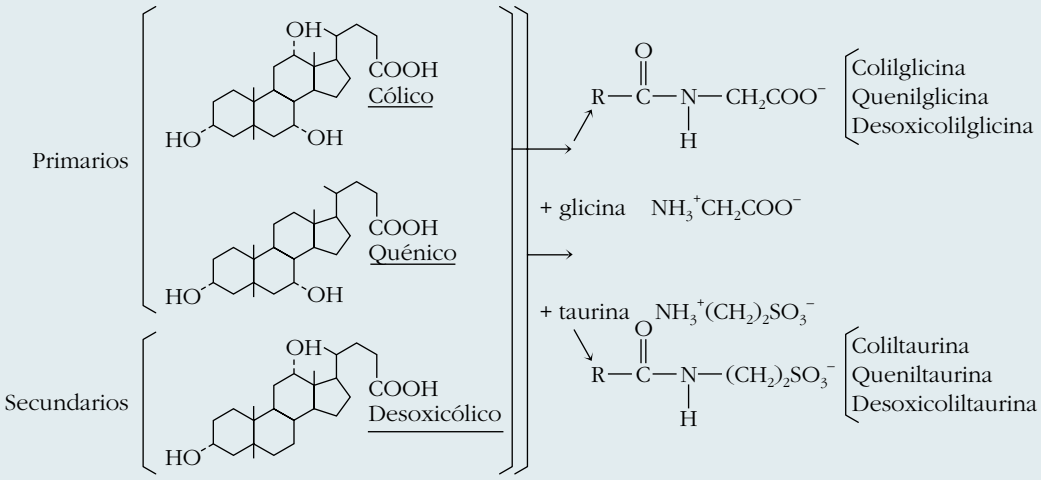


Estereoquímica del ácido cólico

FIGURA 25.29
Ácido cólico, un ácido biliar.

TABLA 25.10 Efecto de la conjugación sobre la acidez de los ácidos cólico, desoxicólico y quenodesoxicólico

Ácido biliar	*Grupo ionizado*	*p*K_a
Ácidos biliares no conjugados	—COO^- del ácido colestanoico	≃ 5
Glicoconjugados	—COO^- de la glicina	≃ 3,7
Tauroconjugados	—SO_3^- de la taurina	≃ 1,5



Fuente: Reproducido con permiso de Hofmann, A. F. *Handbook of Physiology* 5:2508, 1968.

pos apolares, hidrofóbicos, del contacto con el agua y la interacción de grupos polares con moléculas de agua. La distribución de regiones polares y apolares impone algunas restricciones sobre los ordenamientos estereoquímicos de las moléculas de ácidos biliares dentro de una micela. Cuatro moléculas de ácido biliar son suficientes para formar una micela muy sencilla, tal como se muestra en la Figura 25.31. Las micelas de sales biliares pueden solubilizar otros lípidos, tales como fosfolípidos y ácidos grasos. Estas **micelas mixtas** tienen forma de un disco en el que los fosfolípidos y los ácidos grasos forman una bicapa, mientras que los ácidos biliares ocupan los bordes, haciendo que el canto del disco sea hidrofílico (Figura 25.32). Dentro de las micelas mixtas de fosfolípido–ácido biliar se pueden acomodar y, por tanto, "solubilizar" otros lípidos insolubles en agua, tales como el colesterol (respecto a los problemas potenciales, véase Apli. Clín. 25.7).

Durante la digestión de triacilgliceroles, los ácidos grasos libres y los monoacilgliceroles se liberan en la superficie de las gotículas de grasa emulsionada. A diferencia de los triacilgliceroles, que son insolubles en agua, los ácidos grasos libres y los monoacilgliceroles son ligeramente hidrosolubles, y las moléculas de la superficie se equilibran con las que están en solución y en micelas de ácidos biliares. Así, los productos de la hidrólisis de los triacilgliceroles se transfieren continuamente desde las gotículas de emulsión a las micelas (Figura 25.26).

Las micelas constituyen el vehículo principal para el transporte de lípidos desde la luz intestinal a la superficie de la mucosa, en donde tiene lugar la absorción. Debido a que la capa fluida próxima a la superficie celular está mezclada de manera deficiente, el mecanismo de transporte principal para el flujo de soluto a través de esta **capa fluida "sin agitar"** es la difusión a favor del gradiente de concentración. Con este tipo de mecanismo de transporte, la velocidad de aprovisionamiento de nutrientes en la superficie celular es proporcional a su diferencia de concentración entre el grueso de la fase luminal y la superficie celular. Obviamente, la capa fluida sin agitar presenta problemas para los nutrientes escasamente solubles o insolubles, ya que no se pueden alcanzar gradientes de concentración y velocidades de suministro razonables. Las micelas de ácido biliar superan este problema para los lípidos aumentando su concentración efectiva en la capa sin agitar. El aumento de la velocidad de transporte es casi proporcional al incremento de la concentración efectiva, pudiendo llegar a ser hasta de 1000 veces la de los ácidos grasos solubilizados individualmente, en consonancia con la diferente solubilidad de los ácidos grasos en agua según adopten forma de micelas o la de moléculas individuales. Esta relación entre flujo y con-

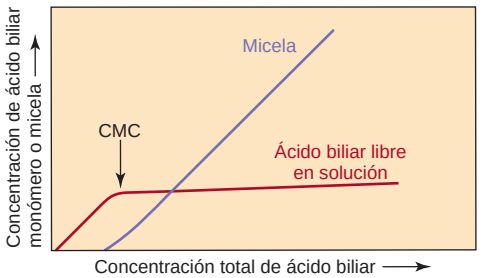


FIGURA 25.30
Propiedades de solubilidad de los ácidos biliares en soluciones acuosas.
Abreviatura: CMC, concentración micelar crítica.

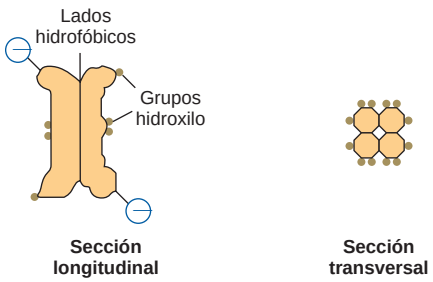


FIGURA 25.31
Representación diagramática de la micela de colato Na^+.
Adaptado de Small, D. M. Biochim. Biophys. Acta *176:178, 1969.*

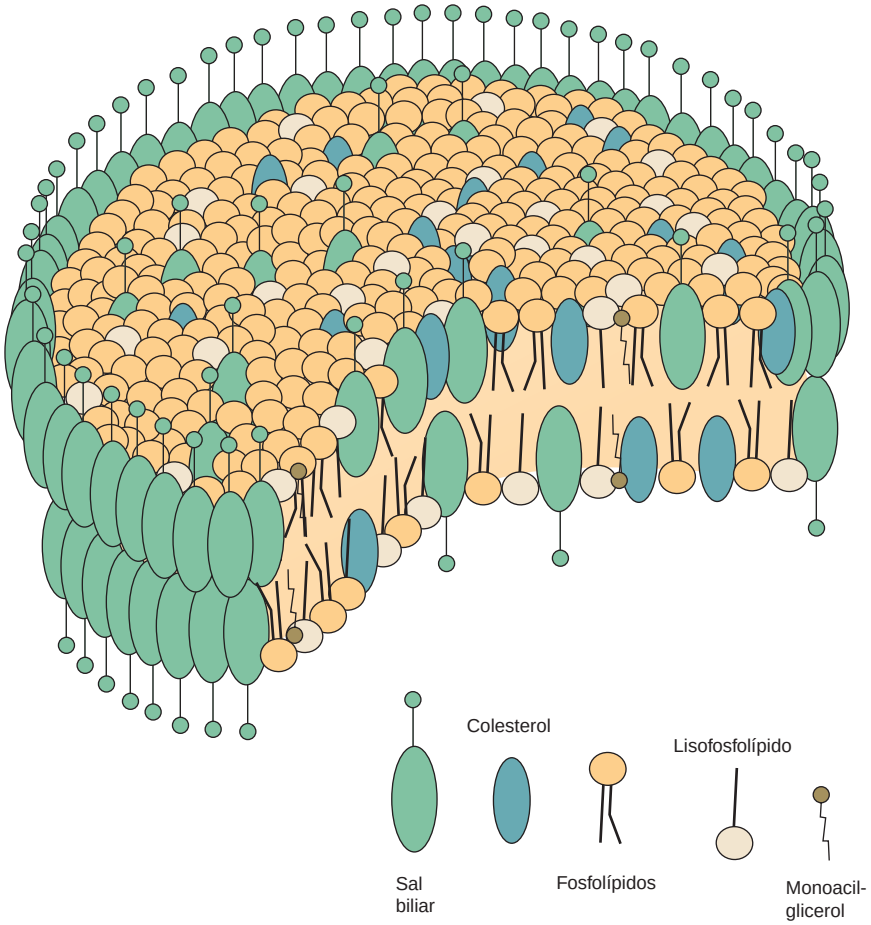


FIGURA 25.32
Estructura propuesta para la micela intestinal mixta.
El disco en bicapa tiene una banda de sales biliares en su periferia y otros componente más hidrofóbicos (ácidos grasos, monoacilgliceroles, fosfolípidos y colesterol) en su interior.
Reproducido con permiso de Carey, M. C. En: A. M. Arias, H. Popper, D. Schachter, et al. (Eds.), The Liver: Biology and Pathology. *New York: Raven Press, 1982.*

centración efectiva es válida al ser la constante de difusión, segundo parámetro que determina el flujo, sólo ligeramente inferior para las micelas mixtas que para las moléculas de lípido libres en solución. Así, la absorción eficiente de lípido depende de la presencia de suficiente ácido biliar para "solubilizar" los lípidos ingeridos e hidrolizados en micelas. En ausencia de ácidos biliares, la absorción de triacilgliceroles no se detiene completamente, si bien se reduce drásticamente su eficiencia. La absorción residual depende de la ligera solubilidad en agua de los ácidos grasos libres y de los monoacilgliceroles. Los lípidos no absorbidos alcanzan la parte inferior del intestino, en donde una pequeña parte puede ser metabolizada por las bacterias. No obstante, el grueso de los lípidos no absorbidos se excreta con las heces (**esteatorrea**).

Las micelas también transportan a través de las capas fluidas no agitadas el colesterol y las **vitaminas A, D, E** y **K**. Para la absorción de estos compuestos la secreción de ácidos biliares es absolutamente esencial.

La mayoría de los lípidos absorbidos se incorporan a los quilomicrones

La captación de lípidos por las células epiteliales tiene lugar por difusión a través de la membrana plasmática. La absorción es prácticamente completa para los ácidos grasos y los monoacilgliceroles, que son ligeramente hidrosolubles. Es menos eficiente para los lípidos insolubles en agua. Por ejemplo, sólo se absorbe el 30–40% del colesterol de la dieta.

Dentro de la célula intestinal, el destino de los ácidos grasos absorbidos depende de la longitud de la cadena. Los **ácidos grasos** con **cadena de longitud corta** y **media** ($\leq$ 10 átomos de carbono) pasan a través de la célula a la sangre portal sin modificación. Los **ácidos grasos de cadena larga** ($>$ 12 átomos de carbono) se unen a una proteína citoplasmática fijadora de ácidos grasos (FABP intestinal o I-FABP) y son transportados al retículo endoplasmático, donde sufren resíntesis hacia triacil-

APLICACIÓN CLÍNICA 25.7
Cálculos de colesterol

Junto con los ácidos biliares, el hígado secreta fosfolípidos y colesterol como componentes de la bilis. Debido a la solubilidad limitada del colesterol, su secreción a la bilis puede dar lugar a la formación de cálculos en la vesícula biliar. Ésta es una complicación relativamente frecuente; hasta un 20% de estadounidenses desarrollará cálculos durante su vida.

El colesterol es prácticamente insoluble en soluciones acuosas. No obstante, se puede incorporar a las micelas mixtas de fosfolípido y ácido biliar hasta una proporción molar de 1:1 para colesterol y fosfolípido, con lo que es "solubilizado" (véase figura adjunta). El hígado puede producir bilis sobresaturada con una proporción molar superior a 1:1 para colesterol respecto al fosfolípido. Este exceso de colesterol tiene tendencia a cristalizar. Esta bilis con exceso de colesterol se considera litogénica, es decir, formadora de piedras o cálculos. La formación de cristales tiene lugar habitualmente en la vesícula biliar, más que en los conductos biliares hepáticos, ya que los tiempos de contacto entre la bilis y cualquier núcleo de cristalización son mayores en la vesícula biliar. Además, en la vesícula biliar se concentra la bilis por absorción de electrolitos y agua. Las sales biliares quenodesoxicolato (Figura 25.33) y su estereoisómero ursodesoxicolato (grupo 7-hidroxilo en posición β) están actualmente disponibles para ser utilizadas por vía oral para disolver cálculos biliares. La ingestión de estas sales biliares reduce la excreción de colesterol a la bilis, y permite la disolución de los cálculos de colesterol.

La tendencia a secretar bilis sobresaturada con respecto al colesterol es congénita y se da más frecuentemente en hembras que en varones, estando a menudo asociada con la obesidad. La sobresaturación también parece ser función del tamaño y naturaleza de la reserva de ácidos biliares, así como de la velocidad de secreción.

Schoenfield, L. J. y Lachin, J. M. Chenodiol (chenodeoxycholic acid) for dissolution of gallstones: The National Cooperative Gallstone Study. A controlled trial of safety and efficacy. *Ann. Intern. Med.* 95:257, 1981; y Carey, M. C. y Small, D. M. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. *J. Clin. Invest.* 61:998, 1978.

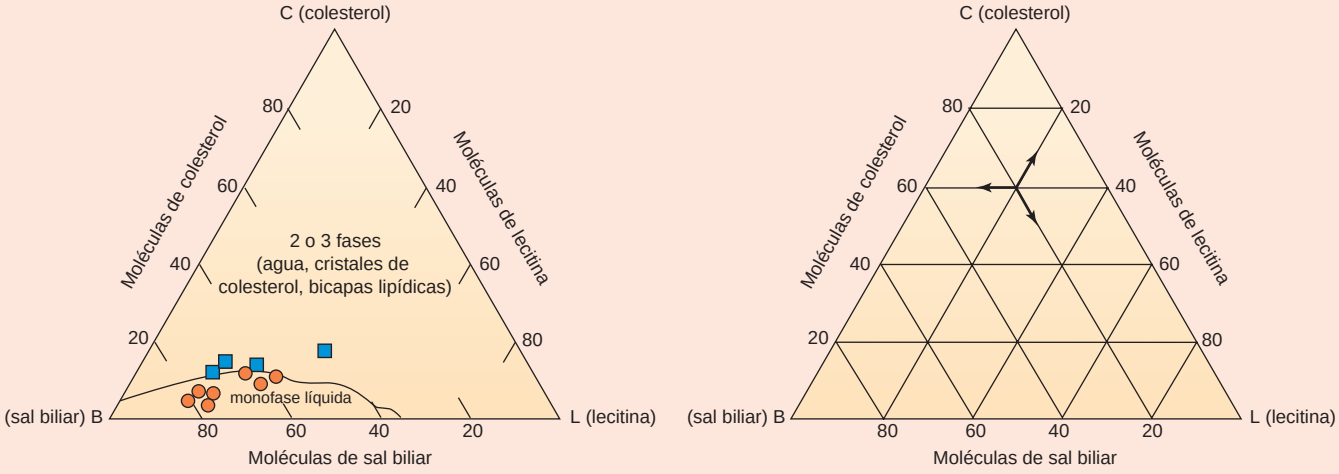
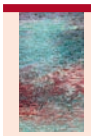


Diagrama de los estado físicos de mezclas de 90% de agua y 10% de lípido.
El 10% de lípido está formado por ácidos biliares, fosfatidilcolina (lecitina) y colesterol, y el triángulo representa todas las proporciones posibles entre los tres constituyentes lipídicos. Cada punto dentro del triángulo corresponde a una composición determinada de los tres componentes, la cual se puede leer a partir de la gráfica en la forma indicada; cada punto situado en uno de los lados corresponde a una composición determinada de sólo dos componentes. El triángulo de la izquierda contiene la composición de muestras de bilis de la vesícula biliar de pacientes sin cálculos (círculos rojo) y con cálculos de colesterol (cuadrados azul). La bilis litogénica tiene una composición que cae fuera del área de "monofase líquida" en la esquina inferior izquierda.
Adaptado de Hofmann, A. F. y Small, D. M. Annu. Rev. Med. *18:362, 1967. Copyright © 1967 by Annual Reviews, Inc.*

gliceroles. El glicerol necesario para este proceso proviene de los 2-monoacilgliceroles absorbidos y, en menor grado, de la glucosa. Los triacilgliceroles resintetizados forman glóbulos lipídicos a los que se adsorben fosfolípidos tensioactivos y proteínas especiales denominadas **apolipoproteínas**. Los glóbulos lipídicos migran en el interior de vesículas unidas a membrana hacia la membrana plasmática contraluminal a través del aparato de Golgi. Finalmente se liberan en el espacio intercelular por fusión de las vesículas con la membrana plasmática contraluminal y desde allí van a través de los vasos linfáticos intestinales (o lacteales) y el conducto torácico a las grandes venas sistémicas. Dado que su tamaño final puede ser de varios micrómetros de diámetro y que salen del intestino por los vasos linfáticos, se los denominan **quilomicrones** (quilo = linfa lechosa, del griego *chylos*, que significa jugo). Las apo-



APLICACIÓN CLÍNICA 25.8
A-β-Lipoproteinemia

La a-β-lipoproteinemia es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la ausencia de todas las lipoproteínas que contienen apo-β-lipoproteína B, es decir, quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (véase p. 745). El nivel de colesterol sérico es extremadamente bajo. Este defecto está asociado con una grave malabsorción de triacilgliceroles y vitaminas liposolubles (especialmente el tocoferol y la vitamina E) y acumulación de apolipoproteína B en enterocitos y hepatocitos. La alteración no parece implicar el gen de la apolipoproteína B, sino más bien una de las varias proteínas que intervienen en la maduración de la apolipoproteína B en el hígado y la mucosa intestinal, o en la formación y secreción de las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles, es decir, quilomicrones y VLDL procedentes de estos tejidos, respectivamente.

Kane, J. P. Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu. Rev. Physiol.* 45:673, 1983; y Kane, J. P. and Havel, R. J. En: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* Vol. 1, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p. 1853.

lipoproteínas intestinales son distintas de las del hígado (p. 127) y se denominan A-1 y B. La **apolipoproteína B** es esencial para la liberación de los quilomicrones a partir de los enterocitos (véase Apli. Clín. 25.8).

Mientras que los ácidos grasos de cadena media que provienen de la dieta llegan al hígado directamente con la sangre portal, los ácidos grasos de cadena larga alcanzan primero el tejido adiposo y muscular a través de la circulación sistémica antes de entrar en contacto con el hígado. Las células grasas y las musculares captan grandes cantidades de lípidos de la dieta para su almacenamiento o metabolismo. El desvío para no penetrar en el hígado puede ser un mecanismo que surgió evolutivamente para proteger a este órgano de una sobrecarga de lípidos después de una comida.

El tratamiento diferencial de los ácidos grasos de cadena media y de cadena larga que hacen las células intestinales se puede explotar de manera específica para proporcionar al hígado nutrientes con alto contenido calórico en forma de ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena corta y media no tienen demasiado buen sabor; sin embargo, los triacilgliceroles sintetizados a partir de estos ácidos grasos son muy sabrosos y se pueden utilizar como parte de la dieta. Los ácidos grasos de cadena corta se producen fisiológicamente en especial en el colon, por bacterias y a partir de glúcidos residuales. Estos ácidos grasos se absorben en la sangre portal.

25.7 METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares se sintetizan dentro del hígado a partir del colesterol, si bien pueden ser modificados por enzimas bacterianos en la luz intestinal. Los **ácidos bilia-**

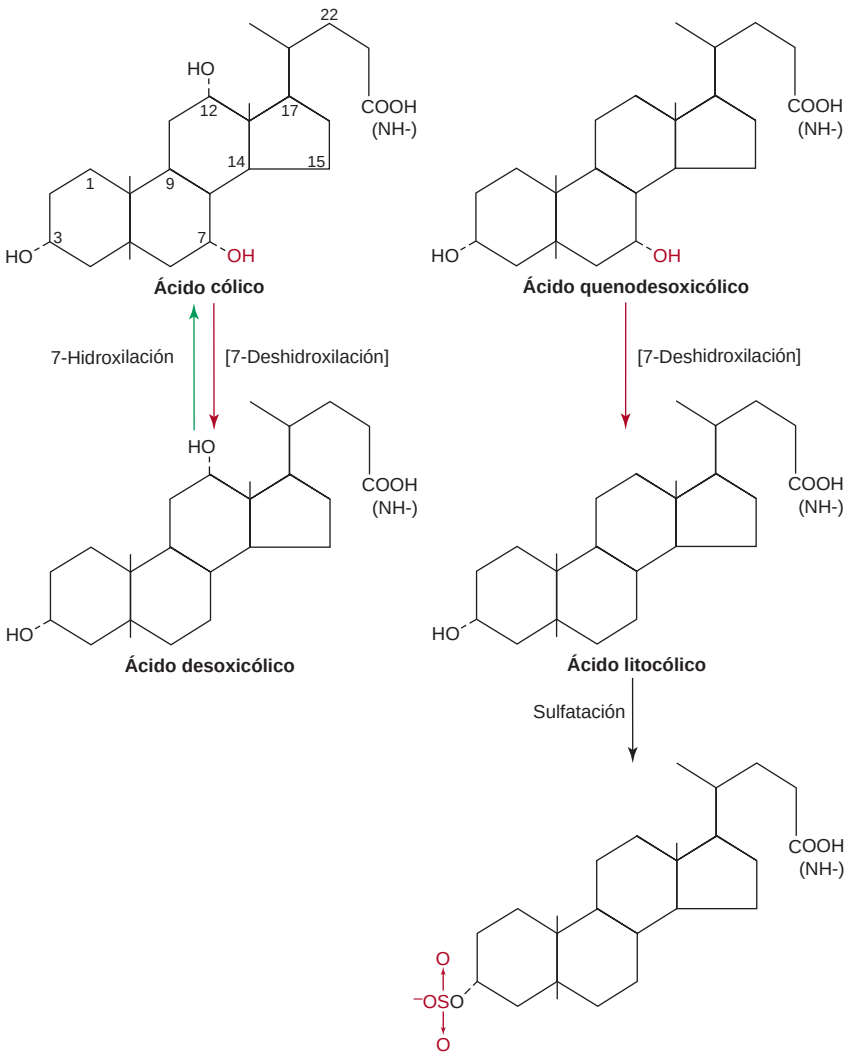


FIGURA 25.33
Metabolismo de los ácidos biliares en la rata. Las flechas verdes y negras indican reacciones catalizadas por enzimas hepáticos; las flechas rojas indican las de los enzimas bacterianos situados dentro de la luz intestinal. (NH—), conjugado con glicina o taurina de los ácidos biliares.

res primarios sintetizados por el hígado son el **ácido cólico** y el **quenodesoxicólico** (o quénico). Los **ácidos biliares secundarios** provienen de los ácidos biliares primarios mediante reducción bacteriana en la posición 7 de la estructura anular, dando lugar a **desoxicolato** y **litocolato**, respectivamente (Figura 25.33).

Los ácidos biliares primarios y secundarios son reabsorbidos por el intestino hacia la sangre portal, de allí son captados por el hígado y continuación son resecretados con la bilis. Dentro del hígado, tanto los ácidos biliares primarios como secundarios se unen a glicina o a taurina mediante un enlace isopeptídico. Estos derivados se denominan **glico-** y **tauroconjugados**, respectivamente, y son las formas que se secretan a la bilis. Mediante la conjugación, el grupo carboxilo del ácido sin conjugar es reemplazado por un grupo aun más polar. Los valores de p*K* del grupo carboxilo de la glicina y del grupo sulfonilo de la taurina son más bajos que los de los ácidos biliares sin conjugar, de modo que los ácidos biliares conjugados permanecen ionizados en un intervalo de pH más amplio. La conjugación se pierde parcialmente dentro de la luz intestinal por hidrólisis del enlace isopeptídico.

La cantidad total de ácidos biliares, conjugados y sin conjugar, secretados diariamente por el hígado es en un adulto de 20–30 g. Sin embargo, el cuerpo mantiene una pequeña reserva de sólo 3–5 g. Una reserva pequeña es ventajosa porque los ácidos biliares son tóxicos a concentraciones elevadas debido a sus propiedades detergentes, por ejemplo a través de su capacidad de lisar células. Por tanto, para alcanzar las velocidades de secreción citadas, los ácidos biliares son reabsorbidos activamente en el íleon inferior, recirculados hacia el hígado y resecretados de 4 a 10 veces por día. Dicho de otra manera, durante una comida, los ácidos biliares de la vesícula biliar y del hígado se liberan a la luz del intestino delgado superior, pasan con el quimo a lo largo de la luz del intestino delgado, se reabsorben hacia la sangre portal por los enterocitos del íleon, y a continuación se extraen de la sangre portal por las células parenquimatosas hepáticas. El proceso de secreción y recaptación es conocido como **circulación enterohepática** (Figura 25.34). La reabsorción de los ácidos biliares por el intestino es muy eficiente, ya que sólo se escapan diariamente de la recaptación unos 0,8 g de ácidos biliares que son excretados con las heces. Los niveles séricos de ácidos biliares varían normalmente con la velocidad de reabsorción y, por consiguiente, alcanzan sus valores más elevados durante una comida.

El colato, desoxicolato, quenodesoxicolato y sus conjugados participan continuamente en la circulación enterohepática. Por el contrario, la mayor parte del ácido litocólico que se produce por acción de los enzimas bacterianos se sulfata a su paso si-

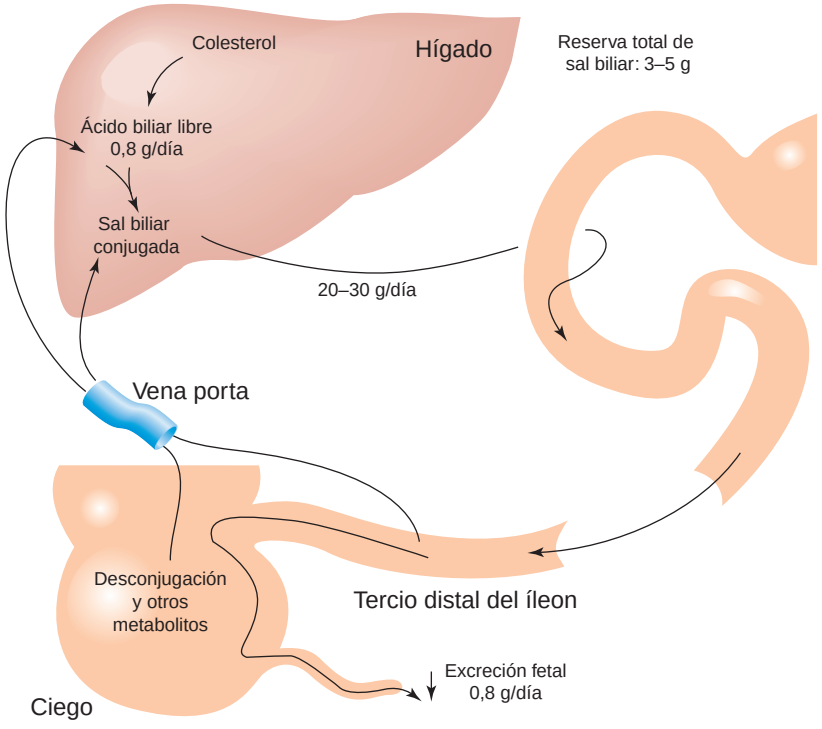


FIGURA 25.34
Circulación enterohepática de los ácidos biliares.
Adaptado de Clark, M. L. y Harries, J. T. En: I. McColl y G. E. Sladen (Eds.), Intestinal Absorption in Man. *New York: Academic Press, 1975, p. 195.*

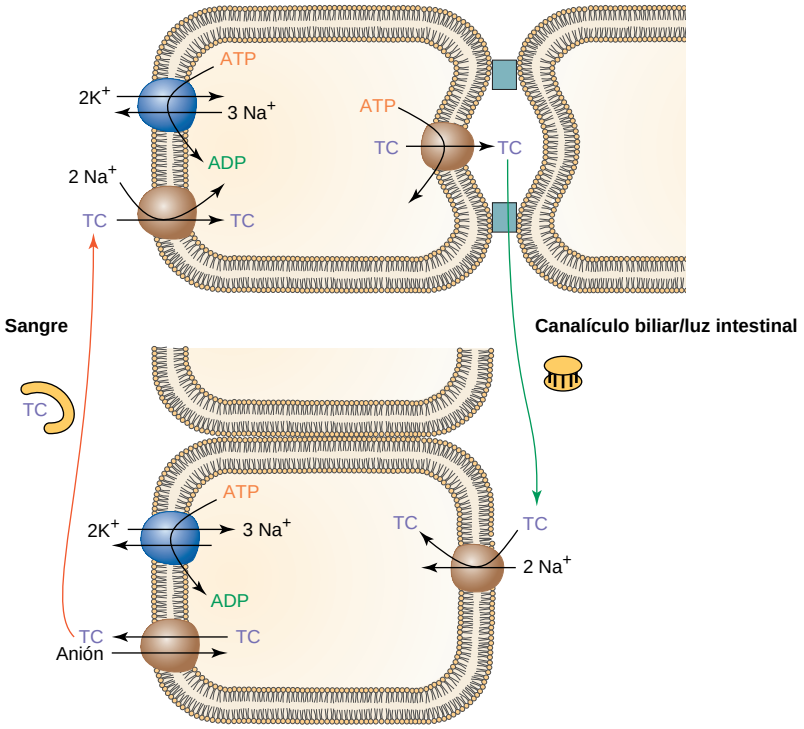


FIGURA 25.35
Mecanismos moleculares del transporte de taurocolato (TC) durante la circulación enterohepática.

guiente por el hígado. El **éster sulfato** del **ácido litocólico** no es sustrato del sistema de transporte de los ácidos biliares del íleon, por lo que se excreta con las heces.

Se han determinado los mecanismos moleculares para el trasnporte activo de los ácidos biliares por las células epiteliales del íleon inferior y las células del hígado (Figura 25.35). La absorción en el íleon se realiza a través de transporte activo secundario vía un sistema de cotransporte Na^+ luminal- ácido biliar (**transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio** o **ASBT**), con una estequiometría de 2:1 para Na^+/ácido biliar. Los ácidos biliares salen de la célula en el lado de la sangre en intecambio con otros tipos de aniones, por ejemplo bicarbonato. La captación de ácidos biliares desde la sangre por las células hepáticas se realiza también a través de un cotransporte secundario activo Na^+-ácido biliar, pero por un transportador diferente (**polipéptido cotransportador de Na^+ taurocolato** o **NTCP**). Por el contrario, la secreción de ácidos biliares por las células hepáticas a través de la membrana plasmática canalicular hacia la bilis, se realiza principalmente por transporte activo primario (**bomba exportadora de sales biliares** o **BSEP**, una **ATPasa** de **tipo ABC**, véase p. 525). Para alcanzar concentraciones totales razonables de ácidos biliares en las células y el plasma, manteniendo a la vez concentraciones libres muy bajas sin acción detergente, los ácidos biliares se unen a proteínas de unión específicas en los enterocitos del íleon y las células hepáticas. La albúmina hace la función de proteína de unión para los ácidos biliares en el plasma.

BIBLIOGRAFÍA

Bahar, R. J. y Stolz, A. Bile acid transport. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 28:27, 1999.

Chang, E. B., Sitrin, M. D. y Black, D. D. *Gastrointestinal, Hepatobiliary, and Nutritional Physiology.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publ., 1996.

Christophe, A. B. y DeVriese, S. (Eds.). *Fat Digestion and Absorption.* Champaign, IL: AOCS Press, 2000.

Cristofaro, E., Mottu, F. y Wuhrmann, J. J. Involvement of the raffinose family of oligosaccharides in flatulence. In: H. L. Sipple and K. W. McNutt (Eds.), *Sugars in Nutrition.* New York: Academic Press, 1974, p. 314.

Field, M. y Semrad, C. E. Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 55:631, 1993.

Hediger, M. A. y Rhoads, D. B. Molecular physiology of sodium–glucose cotransporters. *Physiol. Rev.* 74:993, 1994.

http://gastroenterology.medscape.com

http://www.lactose.net

Johnson, L. R. (Ed.-in-chief). *Physiology of the Gastrointestinal Tract,* Vols. 1 and 2, 2nd and 3rd eds. New York: Raven Press, 1987, 1994.

Kere, J. y Hoglund, P. Inherited disorders of ion transport in the intestine. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:306, 2000.

Mathews, D. M. *Protein Absorption.* New York: Wiley-Liss, 1991.

Meier, P. J. y Stieger, B. Molecular mechanisms of bile formation. *News Physiol. Sci.* 15:89, 2000.

Pandol, S. y Raybauld, H. E. Integrated response to a meal. *The Undergraduate Teaching Project in Gastroenterology and Liver Disease,* Unit #29. American Gastroenterological Assoc. Timonium, MD: Milner-Fenwick, Inc., 1995.
Porter, R. y Collins, G. M. *Brush Border Membranes,* Vol. 95, Ciba Foundation Symposium. London: Pitman, 1983.
Schultz, S. G. (section Ed.). *Handbook of Physiology. Section 6: The Gastrointestinal System, Vol. IV. Intestinal Absorption and Secretion.* (M. Field y R. A. Frizzell, Eds.). Bethesda, MD: American Physiological Society, 1991.
Sleisenger, M. H. (Ed.). Malabsorption and nutritional support. *Clin. Gastroenterol.* 12:323, 1983.
Soleimani, M. y Ulrich, C. D. How cystic fibrosis affects pancreatic ductal bicarbonate secretion. *Med. Clin. North Am.* 84:641, 2000.
Thomson, A. B. R., Schoeller, C., Keelan, M., Smith, L. y Clandinin, M.T. Lipid absorption: passing through the unstirred layers near the brush border membrane, and beyond. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71:531, 1993.
Van-Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T. y van den Heuvel, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br. J. Nutr.* 81:121, 1999.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Las formas activas de la mayoría de los enzimas que digieren la comida pueden encontrarse normalmente en todos los siguientes, EXCEPTO:
   A. en forma soluble en la luz estomacal.
   B. en la saliva.
   C. unidas a la superficie luminal de la membrana plasmática de las células epiteliales intestinales.
   D. disueltas en el citoplasma de las células epiteliales intestinales.
   E. en los gránulos de zimógeno de las células exocrinas pancreáticas.

2. La histamina es un potente secretagogo de:
   A. amilasa por las glándulas salivales.
   B. HCl por el estómago.
   C. gastrina por el estómago.
   D. enzimas hidrolíticos por el páncreas.
   E. $NaHCO_3$ por el páncreas.

3. Las membranas contraluminales de las células epiteliales del intestino delgado contienen:
   A. aminopeptidasas.
   B. Na^+/K^+–ATPasa.
   C. disacaridasas.
   D. GLUT5.
   E. transportador de Na^+–monosacáridos (SGLT1).

4. La digestión del almidón es más eficiente después de calentar el almidón en agua, porque el calentamiento:
   A. hidrata los gránulos de almidón, haciendo que sean más susceptibles a la amilasa pancreática.
   B. convierte los enlaces α-1,4 en enlaces β-1,4, más susceptibles al ataque de las amilasas de mamíferos.
   C. hidroliza parcialmente los enlaces α-1,6.
   D. convierte la amilosa lineal en amilopectina ramificada, que se asemeja al glucógeno.
   E. inactiva los inhibidores de amilasa, frecuentes en los tejidos de plantas que contienen almidón.

5. Las micelas:
   A. son lo mismo que las gotículas de emulsión.
   B. se forman a partir de los ácidos biliares, cualquiera que sea su concentración.
   C. a pesar de que se forman durante la digestión de lípidos, no mejoran sensiblemente la utilización de los lípidos de la dieta.
   D. consisten siempre en una sola especie de lípido.
   E. son esenciales para la absorción de las vitaminas A y K.

6. Las células epiteliales del íleon inferior expresan un intercambiador de Cl^-/HCO_3^- codificado por el gen DRA. Estas células:
   A. realizan un intercambio electrogénico de 2 Na^+ luminales por 1 H^+ citosólico.
   B. absorben Cl^- en la célula en intercambio con HCO_3^- que se mueve hacia la luz.
   C. evitan una acidosis metabólica debida a la pérdida de HCl.
   D. llevan a cabo el movimiento de Na^+ hacia el exterior de las células a la vez que el Cl^- entra en la célula.
   E. llevan a cabo el movimiento de Na^+ hacia el interior de la célula vía un canal de Na^+.

7. Ciertos tejidos llevan a cabo secreción de Cl^- a través de un canal de Cl^- (proteína CFTR— proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística). La toxina del cólera abre de forma anómala el canal ocasionando una pérdida de NaCl. El tratamiento del cólera y las bebidas deportivas para el aporte de electrolitos son fluidos con un contenido elevado de Na^+ y glucosa. La presencia de glucosa facilita la recuperación de NaCl porque:
   A. la absorción de cualquier nutriente causa la captación de Na^+.
   B. la glucosa evita que se excrete el Na^+.
   C. el Na^+ y la glucosa se transportan en direcciones opuestas.
   D. la glucosa es absorbida a través de las células epiteliales intestinales a través de un cotransportador dependiente de Na^+.
   E. la glucosa inhibe la Na^+/K^+ ATPasa.

Preguntas 8 y 9: Una mujer joven observa que cada vez que toma productos lácteos se siente muy mal. Su estómago se distiende, tiene gases y, frecuentemente, diarrea. Un amigo le sugiere que pruebe el yogurt para tomar calcio y es capaz de tolerarlo. Estos síntomas no aparecen cuando toma otras comidas que no sean productos lácteos. Como muchos adultos, tiene una deficiencia en un enzima necesario para la digestión de los glúcidos.

8. El enzima en que más probablemente tiene una deficiencia es:
   A. α-amilasa.
   B. β-galactosidasa (lactasa).
   C. α-glucosidasa (maltasa).
   D. sacarosa-α-glucosidasa (sacarasa).
   E. α,α-trehalasa.

9. Los monosacáridos se absorben del intestino:
   A. por un cotransportador para glucosa y galactosa dependiente de Na^+.
   B. por un transporte facilitado para fructosa independiente de Na^+.
   C. por un transportador independiente de Na^+ (GLUT-2) a través de la mebrana contraluminal.

D. contra un gradiente de concentración si el transportador es dependiente de Na^+.
E. todo lo anterior.

Preguntas 10 y 11: Una mujer llega a urgencias con un fuerte dolor abdominal en el cuadrante superior derecho, así como un fuerte dolor en la espalda. El dolor había empezado unas horas después de que tomara una comida de pollo frito y patatas fritas cubiertas de queso. Los síntomas indicaban "cálculos biliares" y ésto se confirmó por ultrasonidos. Aunque puede que sea necesaria la cirugía en el futuro, se ensayó primero un tratamiento conservador. Se le indicó que limitara las comidas fritas y los productos lácteos ricos en grasa. También se le dió quenodesoxicolato para tomar por vía oral para tratar de disolver los cálculos.

10. Los "cálculos" de colesterol:
    A. normalmente se forman durante el paso de la bilis a través del conducto hepático de la bilis.
    B. tienen lugar cuando las micelas mixtas fosfolípido-ácido biliar son muy ricas en fosfolípido.
    C. pueden disolverse con un exceso de ácidos biliares ya que los ácidos biliares ayudan a solubilizar en micelas el colesterol, insoluble en agua.
    D. raramente se dan, puesto que el colesterol no es un componente normal de la bilis.
    E. son una parte necesaria de la digestión de los lípidos.

11. En el metabolismo de los ácidos biliares:
    A. el hígado sintetiza los ácidos cólico y desoxicólico, que se consideran por tanto los ácidos biliares primarios.
    B. los ácidos biliares secundarios se forman a partir de la conjugación de los ácidos biliares primarios con glicina o taurina.
    C. la 7-deshidroxilación de los ácidos biliares por las bacterias intestinales produce los ácidos biliares secundarios, que tienen propiedades detergentes y fisiológicas similares a los ácidos biliares primarios.
    D. la secreción diaria de ácidos biliares por el hígado es aproximadamente igual a la síntesis diaria de ácidos biliares.
    E. la conjugación reduce la polaridad de los ácidos biliares, reforzando su capacidad de interaccionar con lípidos.

Preguntas 12 y 13: La enfermedad de Hartnup es un defecto genético en un sistema de transporte de aminoácidos. En concreto, el defecto es en el transportador de aminoácidos neutros en las células epiteliales tanto intestinales como renales. Los síntomas clínicos de la enfermedad provienen de las deficiencias en aminoácidos esenciales y nicotinamida (debida a una deficiencia específica de triptófano).

12. ¿Qué otros aminoácidos, además del triptófano, es probable que presenten deficiencias en la enfermedad de Hartnup?
    A. aspartato.
    B. leucina.
    C. lisina.
    D. prolina.
    E. todos los anteriores.

13. Los pacientes con enfermedad de Hartnup son capaces de obtener algunos de los beneficios de las proteínas que consumen porque:
    A. sólo es deficiente el transportador de aminoácidos neutros.
    B. los di- y tripéptidos, productos normales de la digestión de las proteínas, se absorben mediante un transportador diferente (PepT1).
    C. sus endo- y exopeptidasas son normales.
    D. todas las anteriores.
    E. ninguna de las anteriores.

Problemas

14. Utilizando endo- y exopeptidasas conocidas, sugiera una ruta para la degradación completa del siguiente péptido:

    His-Ser-Lys-Ala-Trp-Ile-Asp-Cys-Pro-Arg-His-His-Ala

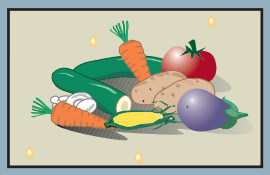
15. ¿En que punto podría la falta de colipasa inhibir la digestión de las grasas?

RESPUESTAS

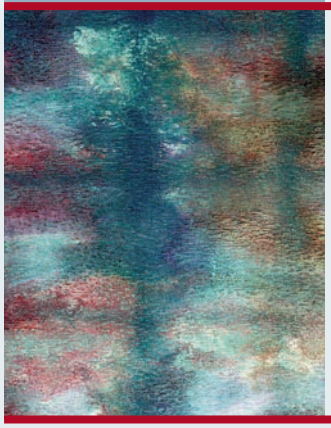
1. **E** Los gránulos de zimógeno contienen proenzimas inactivos o zimógenos, que no se activan hasta después de ser liberados por la célula (la amilasa del páncreas y de las gándulas salivales constituye una excepción).
2. **B** La estimulación de los receptores de H_2 del estómago produce la secreción de HCl. A,D: el secretagogo es la acetilcolina. C: La gastrina es un secretagogo. E: Es estimulado por la secretina.
3. **B** Solamente la superficie contraluminal contiene la Na^+/K^+–ATPasa. Todas las demás actividades se relacionan con la superficie luminal.
4. **A** La α-amilasa ataca más fácilmente al almidón hidratado que al deshidratado; con el calor los gránulos de almidón se hidratan. B: los seres humanos no hidrolizan los enlaces β-1,4. C-E: Nada de esto puede hacerlo el calor.
5. **E** Las vitaminas liposolubles deben ser disueltas en micelas mixtas, como requisito previo a su absorción. A: Las micelas son de dimensiones moleculares y de estructura en equilibrio; las gotículas de emulsión son estructuras metastables mucho mayores. B: La formación de micelas se da únicamente por encima de la concentración micelar crítica (CMC); por debajo de esta concentración los componentes se encuentran en solución simple. C: Las micelas son necesarias para que el enzima tenga acceso a los triacilgliceroles. D: Las micelas pueden consistir en un solo componente, o pueden ser mixtas.
6. **B** El gradiente de protones generado por un intercambio Na^+/H^+ eléctricamente neutro impulsa este intercambio. A: El intercambio Na^+/H^+ vía el transportador NHE3 expresado es eléctricamente neutro. C: La pérdida constante de HCl conduce a una alcalosis metabólica. D: La dirección del movimiento de Na^+ es hacia el interior de la célula, y a continuación se elimina por la Na^+/K^+ ATPasa. E: Esto ocurre en el intestino grueso, no aquí.
7. **D** Esta es una forma más barata y fácil de aumentar los electrolitos corporales que la terapia con fluido intravenoso. A: Sólo algunos nutrientes se absorben mediante cotransportadores dependientes de Na^+. B: No están relacionados. C: Los cotransportadores dependientes de Na^+ transfieren las dos sustancias en la misma dirección. E: La glucosa no tiene ningún efecto sobre este enzima.
8. **B** Los productos lácteos contienen lactosa. La lactosa no digerida es fermentada y produce los síntomas. A, C, D: La deficiencia de cualquiera de ellas causaría problemas con la mayoría de

glúcidos. E: la trehalosa se encuentra en las setas, no en los productos lácteos.

9. **E** Todos ellos juegan un papel importante en la absorción de los monosacáridos a partir de la digestión. D: Esto es especialmente importante para la captación de la mayor parte de glucosa de la dieta, el monosacárido más abundante.
10. **C** Los cálculos se forman cuando la bilis está sobresaturada (proporción de colesterol/fosfolípidos > 1:1). Las sales biliares ingeridas aumentan la solubilización en micelas. A: Los cálculos se forman normalmente en la vesícula biliar. B: El problema es que hay poco fosfolípido en relación al colesterol. D: De hecho, los cálculos son relativamente frecuentes. El colesterol es un componente normal de la bilis. E: Las sales biliares son necesarias para la digestión de los lípidos, pero no los cálculos.
11. **C** Los ácidos biliares primarios (ácidos cólico y quenodesoxicólico) se sintetizan en el hígado. Pueden ser reducidos en el intestino por bacterias, para formar ácidos biliares secundarios — desoxicolato y litocolato. D: Sólo una pequeña fracción de los ácidos biliares escapa a la reabsorción; esta fracción debe ser reemplazada por síntesis. Tanto los ácidos biliares primarios como los secundarios se reabsorben y son recirculados (circulación enterohepática). E: Ambos se conjugan con glicina o taurina, incrementando su polaridad.
12. **B** El Trp comparte un transportador con tyr, phe, val, leu, ile y met. A: El asp es ácido. C: La lisina es básica. D: La prolina es un iminoácido. Todos ellos utilizan transportadores diferentes.
13. **D** El organismo posee por lo menos siete transportadores para las diversas clases de aminoácidos (véase la respuesta 12). También posee un transportador para di- y tripéptidos. C: Como no absorbemos proteína intacta, la presencia de endo- y exopeptidasas es esencial.
14. El corte por tripsina da (a) His-Ser-Lys + (b) Ala-Trp-Ile-Met-Cys-Gly-Pro-Arg + (c) His-His-Ala. La posterior degradación de (a) se consigue con la elastasa y dipeptidasa. La posterior degradación de (b) empezaría con la quimotripsina y utilizaría también dipeptidasas, tripeptidasa, y carboxipeptidasa B. Para degradar (c) bastarían la carboxipeptidasa A y la dipeptidasa. La cuestión es que serían necesarias varias peptidasas con especificidades diferentes.
15. Habría algo de hidrólisis de los triacilgliceroles en el estómago por la lipasa gástrica. En el intestino delgado, la gotícula de emulsión estaría estabilizada por sales biliares pero la lipasa pancreática, que es la responsable de la mayor parte de la hidrólisis, es inactiva en ausencia de colipasa. El procesado de los otros materiales lipídicos no se vería afectado.



26



PRINCIPIOS DE NUTRICIÓN I: MACRONUTRIENTES

Stephen G. Chaney

26.1 VISIÓN GENERAL 1118

26.2 METABOLISMO ENERGÉTICO 1118

El contenido energético de los alimentos se mide en kilocalorías 1118
El consumo energético está influenciado por cuatro factores 1118

26.3 METABOLISMO PROTEICO 1119

Las proteínas de la dieta tienen muchas funciones, entre las que se incluye la producción de energía 1119
El balance de nitrógeno relaciona la captación de nitrógeno con su excreción 1119
Los aminoácidos esenciales deben estar presentes en la dieta 1120
El ahorro proteico está relacionado con el contenido de la dieta en glúcidos y grasas 1122
Las necesidades proteicas normales de un adulto dependen de la dieta 1122
Las necesidades proteicas aumentan durante el crecimiento y la convalecencia de una enfermedad 1122

26.4 MALNUTRICIÓN PROTEICA Y ENERGÉTICA 1123

26.5 EXCESO DE INGESTA PROTEICA Y ENERGÉTICA 1123

La obesidad tiene componentes dietéticos y genéticos 1124
Las consecuencias metabólicas de la obesidad tienen implicaciones importantes en la salud 1124

26.6 GLÚCIDOS 1125

26.7 GRASAS 1126

26.8 FIBRA 1127

26.9 COMPOSICIÓN DE MACRONUTRIENTES EN LA DIETA 1128

La composición de la dieta afecta al colesterol sérico 1128
Los efectos de los glúcidos refinados en la dieta son complejos 1129
La mezcla de proteínas de animales y vegetales satisface las necesidades nutricionales proteicas 1130
Es deseable un aumento en fibra procedente de diversas fuentes 1131
Las recomendaciones actuales abogan por una "dieta prudente" 1131

BIBLIOGRAFÍA 1133

PREGUNTAS 1133

RESPUESTAS 1135

APLICACIONES CLÍNICAS

26.1 Dietas vegetarianas y necesidades proteicas y energéticas 1121
26.2 Dietas pobres en proteína y enfermedad renal 1121
26.3 Provisión de las proteínas y calorías adecuadas para el paciente hospitalizado 1123
26.4 Carga glucídica y resistencia atlética 1125
26.5 Dietas ricas en glúcidos frente a dietas ricas en grasa para diabéticos 1126
26.6 Ácidos grasos poliinsaturados y factores de riesgo en la enfermedad cardíaca 1129
26.7 Adaptación metabólica: relación entre la ingesta de glúcidos y triacilgliceroles séricos 1130

26.1 VISIÓN GENERAL

La mejor definición de la nutrición es la composición y la cantidad de la ingesta de alimentos y la utilización de estos alimentos por los organismos vivos. Dado que el proceso de utilización de los alimentos es bioquímico, el tratamiento de los conceptos básicos de la nutrición en términos bioquímicos será el principal objetivo de los dos capítulos siguientes. El simple conocimiento de los conceptos nutricionales básicos ya no es suficiente. La nutrición parece acarrear más controversia de la que le corresponde en nuestra sociedad, por lo que un conocimiento profundo de la nutrición también requiere un conocimiento de las cuestiones que se hallan detrás de estas controversias. Estos capítulos explorarán las bases bioquímicas de algunas de las controversias nutricionales más importantes.

Se puede dividir el estudio de la nutrición humana en tres áreas: malnutrición, sobrenutrición y nutrición ideal. La preocupación primaria en los Estados Unidos no es la **malnutrición**, ya que las enfermedades nutricionales carenciales son actualmente bastante raras. La **sobrenutrición** es un problema especialmente serio en países desarrollados. Los cálculos actuales sugieren que entre el 15% y 30% de la población de los Estados Unidos es obesa, y se sabe que la obesidad tiene diversas consecuencias graves para la salud. Finalmente, existe un interés creciente acerca del concepto de **nutrición** ideal u **óptima**. Es éste un concepto que sólo tiene sentido en una sociedad rica. Solamente cuando el suministro de alimentos es suficientemente abundante para que las enfermedades carenciales sean raras, es posible considerar los efectos a largo plazo de los nutrientes sobre la salud. Probablemente sea ésta en la actualidad el área de la nutrición más interesante.

26.2 METABOLISMO ENERGÉTICO

El contenido energético de los alimentos se mide en kilocalorías

Deberíamos estar familiarizados con los requerimientos energéticos del cuerpo. La mayor parte de los alimentos que comemos se convierten en ATP y otros compuestos altamente energéticos que son utilizados para impulsar rutas biosintéticas, generar impulsos nerviosos y accionar contracciones musculares. Generalmente describimos el contenido energético de los alimentos en base a sus **calorías**. Hablando técnicamente, esto se refiere a las **kilocalorías** de energía calórica liberadas por la combustión de dicho alimento en el cuerpo. Algunos nutricionistas prefieren utilizar la unidad **kilojoule** (medida de energía mecánica), pero es probable que en un futuro próximo la gente siga contando en calorías, por lo que aquí nos limitaremos a la utilización de esta medida. Los valores calóricos de proteína, grasa, glúcido y alcohol son aproximadamente 4, 9, 4 y 7 kcal g^{-1}, respectivamente. Con estos datos y la cantidad y composición del alimento es sencillo calcular el contenido calórico (ingestión) de los alimentos que comemos. El cálculo del contenido calórico de los alimentos no parece constituir un problema importante en Estados Unidos. Millones de estadounidenses son capaces de hacerlo con facilidad. El problema estriba en equilibrar la ingestión calórica con el gasto calórico. ¿Adónde van estas calorías?

El consumo energético está influenciado por cuatro factores

Existen cuatro factores principales que afectan al gasto energético individual: área superficial (que está relacionada con la altura y el peso), edad, sexo y nivel de actividad. (1) Se cree que los efectos del área superficial están relacionados sencillamente con la velocidad de pérdida calórica por el cuerpo —cuanto mayor es la superficie, mayor será la velocidad de pérdida calórica. Aunque pueda parecer sorprendente, un individuo delgado tiene, de hecho, mayor área superficial, y por consiguiente, unas necesidades energéticas mayores que un individuo obeso del mismo peso. (2) La edad, por otra parte, puede redundar en dos factores: crecimiento y masa muscular sin grasa. En los lactantes y en los niños se precisa un gasto energético mayor para el crecimiento rápido, lo que se refleja en un mayor metabolismo basal (velocidad de utilización de energía en estado de reposo). En los adultos (incluso los adultos delgados) el tejido muscular se reemplaza gradualmente con grasa y agua durante el proceso de envejecimiento, lo que da como resultado una disminución de 2% en el **índice metabólico basal (IMB)** por década de vida adulta. (3) Las mujeres tienden a tener valores de IMB más bajos que los hombres debido a su menor porcentaje de masa muscular magra y a los efectos de las hormonas femeninas sobre el metabolismo. (4) El efecto de

los niveles de actividad sobre las necesidades energéticas es obvio. Sin embargo, se tiende a dar demasiada importancia a los efectos inmediatos del ejercicio, en contraposición a sus efectos a más largo plazo. Por ejemplo, haría falta correr más de una hora para quemar las calorías que proporciona un trozo de pastel de manzana.

El efecto de un programa de **ejercicio** regular sobre el gasto energético puede ser bastante beneficioso. El ejercicio practicado regularmente aumenta el índice metabólico basal, permitiendo quemar calorías más rápidamente las 24 horas del día. Un programa de ejercicio regular debería diseñarse para incrementar la masa del músculo magro, debiéndose repetir 3 ó 5 días a la semana, aunque no es necesario que sea ejercicio aeróbico para que tenga un efecto sobre el índice metabólico basal. En el caso de personas de edad o enfermizas, incluso un paseo diario podría ayudar a incrementar ligeramente el índice metabólico basal.

Los niveles hormonales son también importantes, ya que la tiroxina, las hormonas sexuales, la hormona del crecimiento, y, en menor medida, la adrenalina y el cortisol aumentan el IMB. Los efectos de la adrenalina y el cortisol pueden explicar en parte por qué el estrés grave y traumas importantes incrementan significativamente las demandas energéticas. Finalmente, la captación de energía por sí misma mantiene una relación inversa con el gasto, de modo que durante períodos de **inanición** o semiinanición el IMB puede disminuir hasta un 50%. Ello es de gran valor para la supervivencia en situaciones de inanición real, pero no representa una gran ayuda para aquellas personas que desean perder peso mediante una dieta baja en calorías.

26.3 METABOLISMO PROTEICO

Las proteínas de la dieta tienen muchas funciones, entre las que se incluye la producción de energía

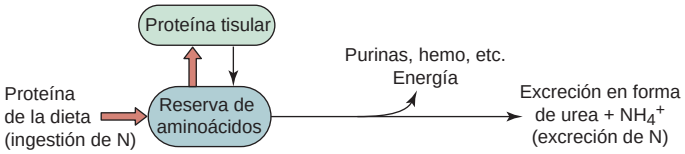
Las **proteínas** se han ganado una cierta reputación como alimento de "construcción del cuerpo". Si bien es cierto que las proteínas son componentes estructurales esenciales de todas las células, las proteínas son igualmente importantes para mantener la producción de secreciones esenciales tales como los enzimas digestivos y las hormonas peptídicas o proteicas. Las proteínas son también necesarias para sintetizar las proteínas plasmáticas, que son esenciales para mantener el equilibrio osmótico, transportar sustancias a través de la sangre y mantener la inmunidad. No obstante, el adulto medio en los Estados Unidos consume mucha más proteína de la necesaria para realizar estas funciones esenciales. El exceso de proteínas se trata como fuente de energía, convirtiéndose los aminoácidos glucogénicos en glucosa y los aminoácidos cetogénicos en ácidos grasos y cetoácidos. Ambos tipos de **aminoácidos** se convierten finalmente en triacilgliceroles en el tejido adiposo si los suministros de grasa y glúcido son ya suficientes para satisfacer las necesidades energéticas. De este modo, para la mayoría de nosotros, la única "construcción del cuerpo" que se obtiene de las dietas con alto contenido proteico es tejido adiposo.

Siempre se ha dicho popularmente que el cuerpo no tiene depósito o almacén para las proteínas, por lo que cada comida ha de aportar la cantidad de proteína adecuada. Pero de hecho, esto no es totalmente correcto. Si bien no existe una proteína específica de "almacenamiento", existe un cierto porcentaje de proteína corporal que experimenta un proceso constante de degradación y resíntesis. En el estado de ayuno se facilita la degradación de esta proteína corporal de almacenamiento y los aminoácidos resultantes se utilizan para la producción de glucosa, la síntesis de compuestos nitrogenados no proteicos y para la síntesis de las proteínas secretoras y plasmáticas esenciales mencionadas anteriormente. Incluso en el estado de nutrición, algunos de estos aminoácidos se utilizan para la producción de energía y como precursores biosintéticos. De este modo, el recambio de la proteína corporal es un proceso normal y un rasgo esencial de lo que se denomina equilibrio nitrogenado.

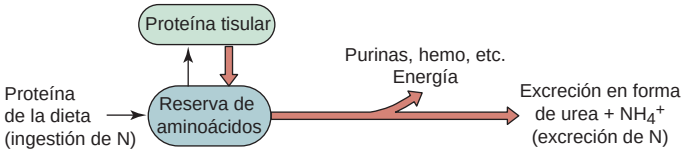
El balance de nitrógeno relaciona la captación de nitrógeno con su excreción

El **balance de nitrógeno** (Figura 26.1) es la relación entre la **ingestión** de nitrógeno (principalmente en forma de proteína) y la **excreción** de nitrógeno (principalmente en forma de proteína sin digerir en las heces y urea y amoníaco en la orina). El adulto normal se encuentra en estado de equilibrio nitrogenado, con las pérdidas equilibradas por la ingestión. El balance de nitrógeno negativo puede provenir de una ingestión de proteína inadecuada con la dieta, ya que los aminoácidos

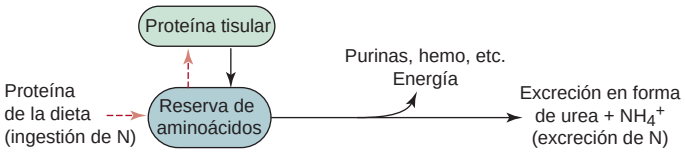
(a) Balance positivo de nitrógeno (crecimiento, embarazo, lactancia y recuperación de estrés metabólico).



(b) Balance negativo de nitrógeno (estrés metabólico).



(c) Balance negativo de nitrógeno (proteína de la dieta inadecuada).



(d) Balance negativo de nitrógeno (falta de aminoácidos esenciales).

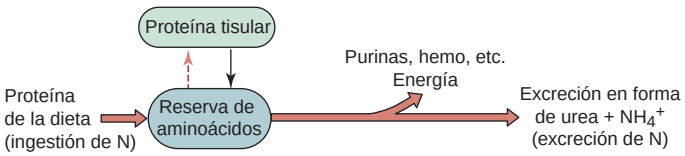


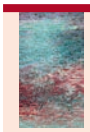
FIGURA 26.1
Factores que afectan al equilibrio nitrogenado. Representaciones esquemáticas de las interrelaciones metabólicas implicadas en la determinación del equilibrio nitrogenado. Cada figura representa el balance de nitrógeno resultante de un conjunto determinado de condiciones metabólicas. Las rutas dominantes de cada situación están indicadas mediante flechas gruesas.

utilizados para reacciones energéticas y biosintéticas no son reemplazados. Lo mismo se observa en las heridas cuando existe una destrucción neta de tejido, así como en los traumas graves o enfermedades en las que existe una respuesta corporal adaptativa que produce un incremento del catabolismo de los depósitos proteicos corporales. Se observa balance positivo de nitrógeno siempre que se produce un incremento neto de los depósitos proteicos corporales, tal como sucede con los niños en crecimiento, una mujer embarazada o un adulto convaleciente.

Los aminoácidos esenciales deben estar presentes en la dieta

Además de la cantidad de proteína de la dieta, existen diversos factores que también han de considerarse. Uno de éstos es el complemento de **aminoácidos esenciales** presentes en la dieta. Los aminoácidos esenciales son aquellos aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo (véase p. 781). Basta que falte en la dieta uno de estos aminoácidos esenciales para que el cuerpo no pueda sintetizar proteína nueva para reemplazar a la proteína perdida debido al recambio normal, lo que produce un balance negativo de nitrógeno (Figura 26.1). Obviamente, el complemento de aminoácidos esenciales en la proteína de la dieta determina en qué grado ésta será utilizada por el cuerpo.

Generalmente, la mayoría de las proteínas animales contienen todos los aminoácidos esenciales en las cantidades aproximadamente necesarias para el cuerpo humano. Las proteínas vegetales, por otro lado, carecen frecuentemente de uno o más aminoácidos esenciales y, en algunos casos, pueden ser más difíciles de digerir. Aun así, las dietas vegetarianas pueden suministrar proteínas adecuadas siempre que se consuma suficiente proteína extra para proporcionar cantidades suficientes de los aminoácidos esenciales o se consuman conjuntamente dos o más proteínas que se complementen entre sí en el contenido de aminoácidos. Por ejemplo, si se combina el maíz (que es deficiente en lisina) con legumbres (que son deficientes en metionina pero ricas en lisina), la eficiencia de utilización de la mezcla de las dos proteí-



APLICACIÓN CLÍNICA 26.1
Dietas vegetarianas y necesidades proteicas y energéticas

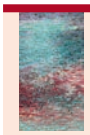
Uno de los problemas más importantes de una dieta puramente vegetariana (en contraposición a una dieta lacto-ovo vegetariana) es la dificultad de obtener suficientes calorías y proteínas. El déficit calórico potencial proviene del hecho que las densidades calóricas de las frutas y verduras son mucho menores que las de las carnes que reemplazan (30–50 cal/100 g frente a 150–300 cal/100 g). El problema proteico tiene tres aspectos: (1) la mayor parte de los productos vegetales tienen muy poca proteína (1–2 g de proteína/100 g frente 15–20 g/100 g); (2) la mayoría de las proteínas vegetales son de bajo valor biológico; y (3) algunas proteínas vegetales se digieren de forma incompleta. En realidad, una dieta vegetariana bien diseñada proporciona habitualmente suficientes calorías y proteínas para el adulto normal. De hecho, la disminución en la ingestión de calorías puede ser beneficiosa debido a que los vegetarianos estrictos tienden a ser más delgados que los correspondientes no vegetarianos.

No obstante, mientras que un varón adulto puede necesitar 0,8 g de proteína y 40 cal kg^{-1} de peso corporal, un niño puede necesitar de 2 a 3 veces esta cantidad. De modo semejante, una mujer embarazada necesita 10 g adicionales de proteína y 300 cal $día^{-1}$ y una mujer que dé el pecho necesita 15 g de proteína y 500 cal adicionales. De este modo, los niños y las mujeres embarazadas o que dan el pecho corren el riesgo de una malnutrición de proteínas y energía. Los hijos de madres vegetarianas generalmente tienen al nacer un peso menor que los hijos de madres que consumen una dieta mixta. De forma similar, los niños vegetarianos presentan, durante los primeros cinco años de vida, menor tasa de crecimiento, si bien suelen recuperarse hacia los 10 años de edad.

Es posible suministrar suficientes calorías y proteínas incluso para estos grupos de riesgo elevado siempre que la dieta esté planificada adecuadamente. Hay tres principios que deben seguirse para diseñar una buena dieta vegetariana suficiente en calorías y proteína para niños: (1) siempre que sea posible incluir huevos y leche en la dieta. Ambos son fuentes excelentes de calorías y de proteínas de calidad elevada; (2) incluir cantidades generosas de alimentos vegetales con alta densidad calórica en la dieta. Entre ellos se cuentan los granos, legumbres secas y frutos secos; y (3) incluir cantidades generosas de alimentos vegetales de alto contenido proteico con patrones de aminoácidos complementarios. Se solía creer que estas proteínas complementarias debían estar presentes en la misma comida. No obstante, estudios recientes en animales sugieren que una comida pobre (pero no carente) en aminoácidos esenciales puede suplementarse añadiendo el aminoácido limitante en una comida posterior.

First International Congress on Vegetarian Nutrition. *Proc. Am. J. Clin. Nutr.* 48 (Suppl. 1):707, 1988; y Saunders, T. A. B. Vegetarian diets and children. *Pediatr. Nutr.* 42:955, 1995.

nas vegetales se acerca a la de la proteína animal. En la Apli. Clín. 26.1 se aborda más detalladamente la adecuación de las dietas vegetarianas con respecto a proteínas y calorías, y en la Apli. Clín. 26.2 se trata la necesidad de una proteína de alta calidad en dietas de bajo contenido proteico en las enfermedades renales.



APLICACIÓN CLÍNICA 26.2
Dietas pobres en proteína y enfermedad renal

La insuficiencia renal crónica se caracteriza por la acumulación de productos finales del catabolismo de las proteínas, principalmente urea. Dado que estos productos tóxicos son responsables de buena parte de los síntomas asociados a la insuficiencia renal, es necesario, habitualmente, cierto grado de restricción de proteínas en la dieta. El grado de restricción de proteína depende de la gravedad de la enfermedad. Es fácil mantener pacientes en situación de equilibrio de nitrógeno durante períodos prolongados mediante dietas que contengan solamente 40 g de proteínas/día, caso de que la dieta contenga suficientes calorías. Las dietas con menos de 40 g/día plantean problemas. El recambio de proteínas continúa, con lo que se ha de obtener un equilibrio que proporcione proteína suficiente para evitar un balance de nitrógeno negativo, pero que al mismo tiempo sea suficientemente escasa para evitar la acumulación de productos de desecho.

La estrategia empleada en tales dietas es doble: (1) proporcionar un mínimo de proteína, principalmente proteína de elevado valor biológico y (2) proporcionar el resto de las calorías diarias en forma de glúcidos y grasas. El objetivo de ello es proporcionar justamente los aminoácidos esenciales suficientes para mantener un balance de nitrógeno positivo. A su vez, el cuerpo debería ser capaz de sintetizar los aminoácidos no esenciales a partir de otros metabolitos nitrogenados. Se proporciona suficiente glúcido y grasa para que, esencialmente, se pueda prescindir de las proteínas de la dieta para el metabolismo energético. Con este tipo de dieta es posible mantener a un paciente con 20 g de proteína/día durante períodos de tiempo considerables. Debido a la dificultad que encierra mantener el equilibrio de nitrógeno con ingestas de proteína tan bajas, se debe hacer un seguimiento del estado proteico del paciente. Esto se puede conseguir midiendo parámetros como la albúmina sérica y la transferrina.

Desgraciadamente, estas dietas son extremadamente monótonas y difíciles de seguir. Una dieta típica de 20 g de proteína consiste en: (1) un huevo más 3/4 de taza de leche o 1 huevo adicional o 1 onz. (30 g) de carne; (2) media libra (225 g) de pan de trigo sin gluten (bajo en proteínas); deben evitarse todos los tipos de pan y cereales restantes, lo que incluye casi todos los alimentos hechos al horno; (3) una cantidad limitada de frutas y verduras con bajo contenido en proteínas y potasio; (4) azúcares y grasas hasta completar el resto de calorías necesarias; sin embargo, deben evitarse los pasteles, tartas y galletas.

Se podría mejorar notablemente el valor gastronómico de estas dietas empezando con una dieta vegana y suplementándola con una mezcla de aminoácidos esenciales y cetoácidos análogos de los aminoácidos esenciales. Esta técnica ayudará a preservar la función renal y proporcionará una variedad de alimentos algo mayor.

Goodship, T. H. J. y Mitch, W. E. Nutritional approaches to preserving renal function. *Adv. Intern. Med.* 33:377, 1988; Dwyer, J. Vegetarian diets for treating nephrotic syndrome. *Nutr. Rev.* 51:44, 1993; y Barsotti, G., Morrell, E., Cupisti, A., Bertoncini, P y Giovannetti, S. A special supplemented "vegan" diet for nephrotic patients. *Am. J Nephrol.* 11:380, 1991.

El ahorro proteico está relacionado con el contenido de la dieta en glúcidos y grasas

Otro factor que determina las necesidades proteicas es la ingestión en la dieta de grasa y glúcidos. Si estos componentes están presentes en cantidades insuficientes, parte de la proteína de la dieta debe utilizarse para la generación de energía, por lo que no está disponible para la formación y reemplazamiento de tejidos. Así, a medida que aumenta el contenido energético (calorías) de la dieta a través de glúcidos y grasas, disminuye la necesidad de proteínas. Este hecho se conoce como **ahorro proteico**. Los glúcidos son algo más eficientes que las grasas en el ahorro proteico, posiblemente debido a que los glúcidos se pueden utilizar como fuente de energía por casi todos los tejidos, mientras que la grasa no.

Las necesidades proteicas normales de un adulto dependen de la dieta

Suponiendo una ingestión calórica adecuada y una eficiencia de utilización del 75%, típica de la proteína mixta en la dieta estadounidense media, la **ingestión recomendada de proteína** es de 0,8 g/ kg^{-1} de peso corporal por día. Esto significa unos 58 g $día^{-1}$ para un hombre de 72 kg, y unos 44 g $día^{-1}$ para una mujer de 55 kg. Estas recomendaciones deberían aumentarse obviamente en el caso de una dieta vegetariana si la eficiencia de utilización global fuese inferior al 75%.

Las necesidades proteicas aumentan durante el crecimiento y la convalecencia de una enfermedad

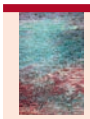
Debido a que las proteínas de la dieta son esenciales para la síntesis de nuevo tejido corporal, así como para su mantenimiento y reparación, las necesidades proteicas aumentan de forma marcada durante los períodos de crecimiento rápido. Este crecimiento tiene lugar durante el embarazo, infancia, niñez y adolescencia.

Una vez consideradas las necesidades de crecimiento, la edad no parece tener demasiado efecto sobre las necesidades proteicas. En todo caso, la necesidad de proteínas puede disminuir ligeramente con la edad. No obstante, la gente de edad necesita, y generalmente consume, menos calorías, por lo que las proteínas de calidad elevada deberían proporcionar un porcentaje mayor de las calorías totales. Además, algunas personas de edad pueden tener necesidades proteicas especiales debido a problemas de mala absorción.

Las enfermedades, los traumas graves y la cirugía dan lugar a una **respuesta catabólica** importante. Las necesidades energéticas y de proteínas son entonces muy grandes, y el cuerpo responde a ello aumentando la producción de glucagón, glucocorticoides y adrenalina. En estas situaciones, la degradación de proteína corporal sufre una gran aceleración, produciéndose un balance negativo de nitrógeno a menos que se aumente la ingestión proteica (Figura 26.1). Aunque este incremento de las necesidades proteicas es insignificante en las enfermedades cortas, sí puede ser de importancia vital en la recuperación de pacientes hospitalizados, tal como se verá en la sección siguiente (véase también Apli. Clín. 26.3).

26.4 | MALNUTRICIÓN PROTEICA Y ENERGÉTICA

La forma más común de desnutrición en el mundo es la **desnutrición proteica y energética (PEM)**. En los países en desarrollo es muy común la ingestión inadecuada de proteínas y energía, siendo habitualmente los lactantes y los niños pequeños los más afectados. Si bien los síntomas de la insuficiencia de proteína y energía varían mucho según el caso, es frecuente clasificar la mayoría de los casos o como **marasmo** o como **kwashiorkor**. El marasmo se define como una ingestión inadecuada tanto de proteínas como de energía. El kwashiorkor se define como una ingestión inadecuada de proteína acompañada de ingestión adecuada de energía. Con mucha frecuencia, las dietas asociadas al marasmo y kwashiorkor pueden ser similares, precipitándose la aparición de este último por condiciones de incremento de demanda proteica como pueden ser las infecciones. El lactante marásmico tiene una apariencia delgada y consumida, y es de tamaño pequeño para su edad. Si la PEM continúa durante el tiempo suficiente, el niño quedará retrasado permanentemente en su desarrollo físico y mental. En el kwashiorkor el paciente presenta una apariencia engañosamente rellena debido al edema. Otros síntomas característicos



APLICACIÓN CLÍNICA 26.3

Provisión de las proteínas y calorías adecuadas para el paciente hospitalizado

La respuesta metabólica normal a la infección, trauma y cirugía es un estado catabólico complejo y cuidadosamente equilibrado. Tal como se ve en el texto, se liberan glucagón, adrenalina y cortisol, lo que acelera en gran medida las velocidades de lipólisis, proteólisis y gluconeogénesis. El resultado neto es un aumento en el suministro de ácidos grasos y de glucosa para satisfacer las necesidades energéticas superiores propias de estas situaciones de estrés importante. La elevada glucosa sérica produce un aumento de los niveles de insulina circulante, que está más que contrarrestado por el aumento en los niveles de adrenalina y otras hormonas. El músculo esquelético utiliza muy poco la glucosa sanguínea, pero utiliza ácidos grasos libres y su propia proteína catabolizada como fuente primaria de energía. Continúa también exportando aminoácidos, principalmente alanina, para su uso en otras partes del cuerpo, lo que conlleva un agotamiento rápido de los depósitos corporales de proteína.

Un paciente hospitalizado con un catabolismo elevado puede precisar 35–45 kcal kg^{-1} $día^{-1}$, y 2–3 g de proteína kg^{-1} $día^{-1}$. Un paciente con quemaduras graves puede precisar aun mayor cantidad de ambos. El médico tiene diversas opciones a su alcance para proporcionar suficientes calorías y proteínas al paciente en el postoperatorio y asegurar así su recuperación óptima. Cuando el paciente no puede ingerir suficiente alimento, puede ser adecuado suplementar la dieta con preparaciones de elevado contenido calórico y elevado contenido proteico, que son habitualmente mezclas de almidón de maíz homogeneizado, huevo, proteína de leche y saborizantes. Cuando el paciente es incapaz de ingerir alimento sólido o no puede digerir de manera adecuada mezclas complejas de alimentos, se administran normalmente dietas elementales mediante un tubo nasogástrico. Las dietas elementales consisten en péptidos pequeños o aminoácidos purificados, glucosa y dextrinas, algo de grasa, vitaminas y electrolitos. A veces, estas dietas son suficientes para satisfacer la mayoría de las necesidades calóricas y proteicas a corto plazo de un paciente con catabolismo moderado.

Cuando el paciente tiene un catabolismo muy pronunciado, o cuando es incapaz de digerir y absorber normalmente los alimentos, se hace necesaria la nutrición parenteral (intravenosa). El método menos agresivo es utilizar una vena periférica de flujo lento, tal como se hace para cualquier otra infusión intravenosa. La limitación principal de este método es la hipertonicidad. No obstante, se puede utilizar sin peligro una solución de glucosa al 5% y de aminoácidos purificados al 4,25%. Esta solución proporciona normalmente suficiente proteína para poder mantener un balance de nitrógeno positivo, aunque sólo en raras ocasiones proporcionará suficientes calorías para el mantenimiento prolongado de un paciente catabólico.

La terapia nutricional más agresiva es la nutrición parenteral total. Normalmente se inserta un catéter (indwelling) en una vena grande de flujo rápido, tal como la vena cava superior, de modo que el fluido de la infusión altamente hipertónica pueda diluirse rápidamente. Esto permite la utilización de soluciones de glucosa de hasta el 60% y de aminoácidos al 4,25%, lo que proporciona suficientes calorías y proteínas para el mantenimiento prolongado. La infusión intravenosa de lípidos se suele aplicar para aumentar las calorías y proporcionar ácidos grasos esenciales. Todos estos métodos pueden utilizarse para prevenir o minimizar el balance de nitrógeno negativo asociado a la cirugía y al trauma. La elección del método depende, de hecho, del estado del paciente. Por regla general es preferible utilizar la técnica menos agresiva.

Streat, S. J. y Hill, G. L. Nutritional support in the management of critically ill patients in surgical intensive care. *World J. Surg.* 11:194, 1987; y The Veterans Affairs Total Parenteral Nutrition Cooperative Study Group. Perioperative total parenteral nutrition in surgical patients. *N. Engl. J. Med.* 325:25, 1991.

del kwashiorkor son el cabello seco y espinoso, diarrea, dermatitis de diversos tipos y crecimiento retardado. El efecto más devastador, tanto del marasmo como del kwashiorkor, es la reducción en la capacidad de los individuos afectados para luchar contra la infección. El número de linfocitos T disminuye (y por tanto también disminuye la respuesta inmunitaria celular), al tiempo que existen defectos en la generación de células fagocitarias y en la producción de inmunoglobulinas, interferón y otros componentes del sistema inmune. Gran parte de estos individuos mueren a consecuencia de infecciones secundarias, más que por la propia inanición.

La forma más común de PEM que se observa en los Estados Unidos en la actualidad tiene lugar en los hospitales. Una secuencia típica de acontecimientos es la siguiente. El paciente no ha comido bien durante varias semanas o meses antes de ingresar en el hospital debido a una enfermedad crónica o debilitante. El paciente ingresa en el hospital con un trauma importante, infección grave o cirugía principal, todos los cuales dan lugar a un balance de nitrógeno muy negativo. Esto se agrava en ocasiones por dificultades para alimentar al paciente o por la necesidad de someterlo a ayuno en preparación para la cirugía o pruebas diagnósticas. El resultado neto es una PEM que se manifiesta en valores bajos de albúmina y otras proteínas séricas, o en pruebas que manifiestan un descenso de la inmunidad celular. Los pacientes hospitalizados con PEM demostrable tardan más en curar de sus heridas, tienen menor resistencia a la infección, se produce en ellos un incremento de mortalidad y aumenta su tiempo de hospitalización. Gran parte de los hospitales más importantes han establecido programas de seguimiento del estado nutricional de sus pacientes hospitalizados para intervenir cuando sea preciso a fin de mantener un balance de nitrógeno y energético positivo (véase Apli. Clín. 26.3).

26.5 EXCESO DE INGESTA PROTEICA Y ENERGÉTICA

Mucho se ha hablado en los últimos años sobre las grandes cantidades de proteína que consume el estadounidense medio. Ciertamente, muchos consumen mucha

más proteína de la necesaria para mantener un equilibrio nitrogenado. El estadounidense medio consume actualmente 99 g de proteína, 68% de la cual es de origen animal. Sin embargo, un adulto sano puede consumir dicha cantidad de proteína sin daño aparente. Existe preocupación acerca del posible efecto de la ingestión elevada de proteínas sobre las necesidades de calcio. Algunos estudios sugieren que la ingesta de cantidades elevadas de proteína aumenta la pérdida urinaria de calcio y puede acelerar la desmineralización ósea asociada al proceso de envejecimiento. No obstante, la cuestión está lejos de estar resuelta.

La obesidad tiene componentes dietéticos y genéticos

Quizás el problema nutricional más serio en los Estados Unidos es la ingesta excesiva de energía. De hecho, la **obesidad** constituye la enfermedad nutricional más frecuente en dicho país. Sin embargo, sería injusto considerar la obesidad como un simple problema de exceso de consumo. La sobrealimentación juega un papel importante en muchos individuos, así como la falta de ejercicio, pero existe también un componente genético importante. Si bien el mecanismo bioquímico de esta predisposición genética no está claro, se ha identificado en ratones y humanos un gen de obesidad que parece regular la obesidad mediante su influencia sobre el apetito y la deposición de grasas. Este gen produce una proteína denominada leptina. Al principio se creía que la leptina podría ser una terapia útil para la obesidad. Sin embargo, ahora está claro que la mayoría de los individuos obesos ya producen un exceso de leptina y que esto tiene tanto efectos negativos como beneficiosos (véase más adelante). La caracterización detallada de éste y otros genes que predisponen a la obesidad en animales, puede proporcionar pistas valiosas acerca de las causas y el tratamiento de la obesidad en humanos.

Las consecuencias metabólicas de la obesidad tienen implicaciones importantes en la salud

Una exposición detallada sobre el tratamiento de la obesidad está más allá del ámbito de este capítulo, pero vale la pena considerar algunas de las consecuencias metabólicas de la obesidad. Una característica clínica llamativa de los individuos con exceso de peso es una marcada elevación en ellos de los ácidos grasos libres, colesterol y triacilgliceroles en el suero, independientemente de la ingestión de grasa con la dieta. ¿Por qué es esto así? La obesidad está asociada, obviamente, a un aumento en el número y/o tamaño de las **células del tejido adiposo**. Estas células producen un exceso de factores como la **leptina** y el **factor de necrosis tumoral α (TNF-α)**, lo cual produce resistencia celular a la **insulina** mediante la interferencia en la **autofosforilación** del **receptor de la insulina (IR)** y la subsiguiente fosforilación **del sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS-1)** (véase p. 944). Inicialmente, el páncreas mantiene el control glucémico mediante una sobreproducción de insulina. De este modo, muchos individuos obesos que tienen un control de la glucosa en sangre aparentemente normal, tienen un síndrome caracterizado por resistencia a insulina en el tejido periférico y elevadas concentraciones de insulina en la circulación. Esta hiperinsulinemia parece estimular el sistema nervioso simpático, dando lugar a la retención de agua y sodio, así como a una vasoconstricción, fenómenos que tienden a aumentar la presión sanguínea.

La resistencia a insulina en el tejido adiposo produce un aumento en la actividad de la lipasa sensible a hormona, la cual cosa, junto con el incremento de la masa del tejido adiposo, es probablemente suficiente para explicar el aumento de ácidos grasos libres circulantes. Este exceso de ácidos grasos se transporta al hígado, donde se convierte en triacilglicerol y colesterol. El exceso de triacilglicerol y de colesterol se libera en forma de partículas de lipoproteína de muy baja densidad, lo que da lugar a un aumento en los valores circulantes de triacilglicerol y colesterol. Por razones que aún no están claras, esto produce también un descenso de las partículas de lipoproteína de alta densidad.

A la larga, la capacidad del páncreas de producir un exceso de insulina decae, lo que lleva a unos niveles de azúcar en la sangre más elevados durante el ayuno, así como una disminución de la tolerancia a la glucosa. El 80% de los diabéticos de aparición adulta (tipo II) tienen exceso de peso. Debido a estos cambios metabólicos, la obesidad constituye uno de los factores de riesgo primarios de enfermedad coronaria, hipertensión y diabetes mellitus. Esto es significativo nutricionalmente, ya que todos estos cambios metabólicos son reversibles. Muy a menudo la reducción al peso ideal es el objetivo individual más importante de la terapia nutricional.

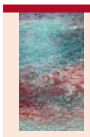
Además, cuando el individuo se encuentra en el peso ideal, la composición de la dieta se convierte en una consideración menos importante para mantener las concentraciones séricas normales de lípidos y glucosa.

Cualquier exposición sobre los regímenes de reducción de peso debería incluir una mención de otra consecuencia metabólica de la obesidad. Como ya se ha visto anteriormente, la obesidad puede conducir a un aumento en la retención de sodio y de agua. A medida que se metabolizan los depósitos de grasa, se convierten en agua (que es más densa que la grasa), la cual puede ser retenida en gran parte. De hecho, en algunos individuos puede aparecer un aumento de peso a corto plazo con algunas dietas aun cuando la dieta funcione perfectamente con respecto a la degradación del tejido adiposo. Este hecho metabólico puede ser devastador desde el punto de vista psicológico para las personas que siguen el régimen, las cuales esperan tener resultados rápidos de su sacrificio.

26.6 | GLÚCIDOS

El papel metabólico principal de los glúcidos de la dieta es la producción de energía. Todo glúcido que esté en exceso respecto del necesario para la energía se convierte en glucógeno y triacilglicerol para su almacenamiento a largo plazo. El cuerpo se puede adaptar a un intervalo amplio de niveles glucídicos en la dieta. Las dietas ricas en glúcidos producen en el estado estacionario niveles más elevados de glucoquinasa y de algunos de los enzimas que intervienen en la desviación de las pentosas monofosfato y síntesis de triacilgliceroles. Las dietas pobres en glúcidos producen en el estado estacionario niveles más elevados de algunos enzimas que intervienen en la gluconeogénesis, oxidación de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos. Los **depósitos de glucógeno** también pueden resultar afectados por el contenido glucídico de la dieta (véase Apli. Clín. 26.4).

Los problemas nutricionales más comunes que afectan a los glúcidos son los de intolerancia glucídica. La forma más común de **intolerancia glucídica** es la dia-



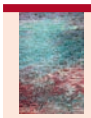
APLICACIÓN CLÍNICA 26.4
Carga glucídica y resistencia atlética

La práctica de la carga glucídica se remonta a observaciones realizadas a principios de la década de 1960, en las que la resistencia durante el ejercicio vigoroso estaba limitada principalmente por los depósitos de glucógeno musculares. Por supuesto, estos depósitos no constituyen la única fuente de energía del músculo. Los ácidos grasos libres están presentes en la sangre durante el ejercicio vigoroso, y son utilizados por el músculo junto con los depósitos de glucógeno. Sin embargo, cuando estos depósitos se han agotado, el músculo no puede utilizar exclusivamente los ácidos grasos libres sin fatigarse rápidamente. Esto se encuentra probablemente relacionado con el hecho que el estado de hipoxia del músculo es cada vez mayor durante un ejercicio vigoroso. Mientras que los depósitos de glucógeno pueden ser utilizados tanto de forma aeróbica como anaeróbica, los ácidos grasos sólo pueden serlo aeróbicamente. En tales condiciones, los ácidos grasos no pueden proporcionar ATP con la rapidez necesaria para actuar como única fuente de energía.

Así, la práctica de la carga glucídica para incrementar los depósitos de glucógeno fue ideada para los atletas y otros deportistas de resistencia. Originalmente se pensó que era necesario engañar al cuerpo, con el objeto de aumentar las reservas de glucógeno. La dieta inicial de carga glucídica consistía en un período de 3–4 días de ejercicio duro, al tiempo que se consumía una dieta pobre en glúcidos, a los que seguían 1–2 días de ejercicio ligero con una dieta rica en glúcidos. El período inicial, con pocos glúcidos y con una demanda energética elevada, produce un agotamiento de los depósitos de glucógeno muscular. Aparentemente, el cambio posterior a una dieta rica en glúcidos produce un ligero efecto de rebote, que conlleva la producción de niveles de insulina y hormona del crecimiento superiores a los normales. En estas condiciones se favorece el almacenamiento del glucógeno aumentando a un valor doble del normal. Esto aumenta de manera significativa la resistencia. En un estudio, individuos bajo control sometidos a una dieta rica en grasas y proteína tenían menos de 1,6 g de glucógeno por 100 g de músculo y podían realizar un trabajo normal solamente durante 60 min. Cuando los mismos individuos siguieron a continuación una dieta con elevado contenido glucídico durante 3 días, sus depósitos de glucógeno aumentaron a 4 g por 100 g de músculo y pudieron realizar el mismo tipo de trabajo durante 4 h.

Así, la técnica funcionaba claramente, pero los atletas se sentían a menudo somnolientos e irritables durante la fase de bajo consumo de glúcidos, mientras que la dieta rica en grasas contradecía las recomendaciones sanitarias. Afortunadamente, estudios recientes han demostrado que el consumo regular de una dieta rica en glúcidos complejos y pobre en grasas durante los períodos de entrenamiento aumenta los depósitos de glucógeno sin necesidad de engañar al cuerpo con cambios bruscos de dieta. Así, las recomendaciones actuales para atletas de fondo se basan en el consumo de una dieta rica en glúcidos (poniendo énfasis en los glúcidos complejos) durante los entrenamientos. A continuación, se incrementa la ingestión de glúcidos (hasta un 70% de las calorías) y se disminuye el ejercicio durante los 2–3 días anteriores a la prueba deportiva. Esto incrementa los depósitos de glucógeno musculares de forma comparable a como lo hacen los regímenes de carga glucídica originales.

Conlee, R. K. Muscle glycogen and exercise endurance: a twenty-year perspective. *Exer. Sports Sci. Rev.* 15:1, 1987; Ivey, J. L., Katz, A. L., Cutler, C. L., Sherman, W. M. y Cayle, E. F. Muscle glycogen synthesis after exercise: effect of time of carbohydrate ingestion. *J. Appl. Physiol.* 64:1480, 1988; y Probart, C. K., Bird, P. J. y Parker, K. A. Diet and athletic performance. *Med. Clin. North Am.* 77:757, 1993.



APLICACIÓN CLÍNICA 26.5

Dietas ricas en glúcidos frente a dietas ricas en grasa para diabéticos

Durante años la American Diabetes Association ha recomendado para los diabéticos dietas bajas en grasas y ricas en glúcidos complejos y fibras. La lógica de tal recomendación parecía evidente. Los diabéticos tienen tendencia a la hiperlipidemia, con el riesgo consiguiente de enfermedad cardíaca y las dietas bajas en grasas parecían apropiadas para reducir el riesgo de la hiperlipidemia y de las enfermedades cardíacas. Además, numerosos estudios clínicos sugerían que se producía una mejora en el control del azúcar sanguíneo por el alto contenido en fibra de la dieta. Esta recomendación ha dado lugar a ciertas controversias. El conocimiento de éstas ilustra la gran dificultad que comporta el establecimiento de recomendaciones dietéticas en grupos de población, frente a una mayor facilidad en casos individuales. En primer lugar, es muy complicado efectuar cambios importantes en la composición de la dieta sin modificar otros componentes de la alimentación. De hecho, la mayoría de los ensayos clínicos sobre la dieta rica en glúcidos y fibra han dado lugar a una disminución importante de peso, bien por el diseño de la dieta, bien por su baja densidad calórica. Se sabe que la reducción de peso mejora el control de la diabetes, por lo que no está claro si las mejoras observadas en los grupos tratados eran debidas a un cambio de la dieta *per se* o a la pérdida de peso. En segundo lugar, existe una variación individual significativa en la respuesta de los diabéticos a estas dietas. Muchos pacientes diabéticos parecen mostrar un menor control (que se manifiesta por un aumento de los niveles de glucosa en sangre, niveles de VLDL y/o LDL elevados, y niveles de HDL reducidos) con dietas ricas en glúcidos y en fibra que con dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados. Sin embargo, las dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados tienden a poseer una mayor densidad calórica y no son apropiadas para individuos con sobrepeso que presentan diabetes del tipo 2 (no dependiente de insulina). Así, una única dieta puede no ser igualmente recomendable para todos los diabéticos. Incluso el concepto "índice glucémico" (véase Tabla 26.2) también puede resultar de difícil aplicación cuando se considera a la población diabética como un todo, debido a las variaciones individuales. En 1994 la American Diabetes Association abandonó la idea de una única dieta para diabéticos. Por el contrario, sus recomendaciones se basan en la consecución de unos objetivos respecto a los niveles de glucosa y lípidos y de presión sanguínea, con una reducción de peso y unas recomendaciones dietéticas basadas en las preferencias individuales y en los mecanismos que mejor funcionan en cada individuo para obtener el control metabólico.

Jenkins, D. J. A., Wolener, T. M. S., Jenkins, A. L. y Taylor, R. H. Dietary fiber, carbohydrate metabolism and diabetes. *Mol. Aspects Med.* 9:97, 1987; Garg, A., Grundy, S. M. y Unger, R. H. Comparison of the effects of high and low carbohydrate diets on plasma lipoproteins and insulin sensitivity in patients with mild NIDDM. *Diabetes* 41;1278, 1992; American Diabetes Association. Nutritional recommendations and principles for people with diabetes. *Diabetes Care* 17:519, 1994; y Nuttall, F. Q. y Chasuk, R. M. Nutrition and the management of type 2 diabetes. *J. Fam. Pract.* 47:S45, 1998.

betes mellitus, provocada por una producción de insulina más baja de lo normal o por falta de receptores de insulina. Esto da lugar a una intolerancia a la glucosa y a los azúcares fácilmente convertibles en glucosa. El tratamiento dietético de la diabetes se aborda en la Apli. Clín. 26.5. La **insuficiencia de lactasa** (véase p. 1103) también es una enfermedad común del metabolismo glucídico que afecta a más de 30 millones de personas solamente en los Estados Unidos. Tiene una gran incidencia entre los negros, asiáticos e hispanos. Sin el enzima lactasa, la lactosa no se hidroliza o absorbe de manera significativa. Permanece en el intestino, en donde actúa osmóticamente drenando agua al interior del intestino, sirviendo como sustrato para su conversión en ácido láctico y CO_2 por las bacterias intestinales. El resultado final es hinchazón, flatulencia y diarrea, todos los cuales se pueden evitar sencillamente eliminando la leche y los productos lácteos de la dieta.

26.7 | GRASAS

Los **triacilgliceroles**, o grasas, pueden ser utilizados directamente por muchos tejidos corporales como fuente energética y, al igual que los fosfolípidos, son un constituyente importante de la membrana. Todo exceso de grasa de la dieta puede almacenarse solamente en forma de triacilglicerol. Al igual que con los glúcidos, el cuerpo humano se puede adaptar a un amplio intervalo de ingestión de grasas. Sin embargo, en ambos extremos (alto o bajo) de consumo de grasas se pueden producir problemas. En el extremo inferior, el **déficit de ácidos grasos esenciales (EFA)** puede convertirse en un problema. Los ácidos grasos linoleico y linolénico no pueden ser sintetizados por el cuerpo, por lo que son componentes esenciales de la dieta. Estos EFA son necesarios para mantener la función e integridad de la estructura de la membrana, para el metabolismo y transporte de las grasas y para la síntesis de **prostaglandinas** y compuestos relacionados. El síntoma más característico de la carencia de ácidos grasos esenciales es una dermatitis escamosa. La carencia de EFA es muy rara en los Estados Unidos, observándose principalmente en criaturas de bajo peso en el nacimiento y que han sido alimentadas con fórmulas artificiales sin EFA, así como en pacientes hospitalizados mantenidos exclusivamente a base de nutrición parenteral durante largos períodos de tiempo. En el extremo superior de la escala, existe la preocupación de que el exceso de grasa en la dieta produce un aumento de los lípidos sé-

ricos y, por consiguiente, un mayor riesgo de enfermedades cardíacas. Estudios recientes sugieren que la ingesta elevada de grasas está asociada a un mayor riesgo de cáncer de colon, mama y próstata; sin embargo, no está claro si el riesgo de cáncer está relacionado con la ingestión de grasa *per se* o con el exceso de calorías que implica una dieta de este tipo. Estudios en animales sugieren que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie ***ω***-6 podrían ser más cancerígenos que otros ácidos grasos insaturados. Se desconoce la razón de ello, aunque se ha sugerido que las prostaglandinas derivadas de los ácidos grasos ***ω***-6 podrían estimular la progresión de los tumores.

26.8 FIBRA

La fibra de la dieta hace referencia a aquellos componentes de la comida que no pueden ser degradados por los enzimas digestivos humanos. No es correcto, sin embargo, considerar que la fibra es indigerible, ya que algunas fibras son, de hecho, al menos parcialmente degradadas por la acción de las bacterias intestinales. En la pasada década aumentó considerablemente el conocimiento acerca del papel de la fibra en el metabolismo humano. La visión actual de los efectos metabólicos de la fibra de la dieta se basa en tres observaciones importantes: (1) existen diversos tipos de fibra de la dieta, (2) cada uno de ellos posee diferentes propiedades físicas y químicas y (3) cada uno de ellos produce efectos diferentes sobre el metabolismo humano, lo que puede explicarse, en parte, por sus propiedades diferenciales.

En la Tabla 26.1 se resumen los principales tipos de fibra y sus propiedades. La **celulosa** y la mayor parte de las **hemicelulosas** hacen aumentar el volumen de las deposiciones y disminuyen el tiempo de tránsito y están asociadas a los efectos de la fibra sobre la regularidad. Hacen disminuir la presión intracolónica y parecen jugar un papel beneficioso respecto a las enfermedades diverticulares. Gracias a que diluyen carcinógenos potenciales y aumentan la velocidad de su tránsito a través del colon, estas fibras también podrían ayudar a reducir el riesgo de cáncer de colon. Las **ligninas** juegan un papel ligeramente diferente. Además de su capacidad para hacer aumentar el volumen de las heces, también adsorben sustancias orgánicas tales como el colesterol, de modo que disminuyen la concentración plasmática de colesterol. Las **fibras mucilaginosas**, tales como la **pectina** y las **gomas**, tienden a formar geles viscosos en el estómago e intestino y a disminuir la velocidad de vaciado estomacal, con lo que disminuye también la velocidad de absorción de muchos nutrientes. El papel clínico más importante de estas fibras es el de hacer disminuir la velocidad con la que se digieren y absorben los glúcidos. De esta manera, si se ingieren estas fibras junto con alimentos que contengan glúcidos, disminuyen significativamente el aumento de los niveles de azúcar en la sangre y, consiguientemente, el aumento de los niveles de insulina. Las **fibras hidrosolubles** (pectinas, gomas, algunas hemicelulosas y los polisacáridos de reserva) ayudan también a disminuir los niveles de colesterol sérico en la mayoría de las personas. No se sabe si esto se debe a su efecto sobre los niveles de insulina (la insulina estimula la síntesis y exportación de colesterol) o a otros efectos

TABLA 26.1 Tipos principales de fibra y sus propiedades

Tipo de fibra	*Fuente principal en la dieta*	*Propiedades químicas*	*Efectos fisiológicos*
Celulosa	Cereales no refinados	No digerible	Aumenta el volumen de las heces
	Salvado	Insoluble en agua	Disminuye el tiempo de tránsito intestinal
	Trigo entero	Absorbe agua	Disminuye la presión intracolónica
Hemicelulosa	Cereales no refinados	Parcialmente digerible	Aumenta el volumen de las heces
	Algunas frutas y verduras	Normalmente insoluble en agua	Disminuye el tiempo de tránsito intestinal
	Trigo entero	Absorbe agua	Disminuye la presión intracolónica
Lignina	Partes leñosas de verduras	No digerible	Aumenta el volumen de las heces
		Insoluble en agua	Une colesterol
		Absorbe sustancias orgánicas	Une carcinógenos
Pectina	Frutas	Digerible	Disminuye la velocidad de vaciado gástrico
		Soluble en agua	Disminuye la velocidad de captación de azúcar
		Mucilaginosa	Reduce el colesterol sérico
Gomas	Legumbres	Digerible	Disminuye la velocidad de vaciado gástrico
	Avena	Soluble en agua	Disminuye la velocidad de captación de azúcar
		Mucilaginosa	Reduce el colesterol sérico

metabólicos (producidos quizá por productos finales de digestiones bacterianas parciales). Las verduras, el trigo y la mayoría de la fibra procedente de cereales son la fuente más adecuada de celulosa, hemicelulosa y lignina insolubles. Las frutas, avena y legumbres son la mejor fuente de fibras solubles. Obviamente, una dieta equilibrada debe contener alimentos que sean fuente tanto de fibra soluble como insoluble.

26.9 | COMPOSICIÓN DE MACRONUTRIENTES EN LA DIETA

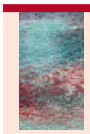
De la exposición anterior se infiere que existen pocos casos de carencias de macronutrientes en la dieta de los países desarrollados. Así, en los últimos años, el interés se ha centrado en la cuestión de si existe una composición ideal de la dieta que esté en consonancia con una buena salud. Sería fácil tildar tales discusiones de puramente académicas, pero el conocimiento de estos temas podría también ser vital. Las enfermedades cardíacas, la apoplejía y el cáncer matan a muchas personas cada año, y si algunos expertos están, aunque sólo sea parcialmente, en lo cierto, se podrían evitar muchas de estas muertes con una dieta prudente.

La composición de la dieta afecta al colesterol sérico

Gran parte de las discusiones actuales acerca de las enfermedades cardíacas se centran alrededor de dos temas clave: (1) ¿Se puede controlar la concentración sérica de colesterol y triacilglicerol con la dieta? (2) ¿La disminución de los niveles séricos de colesterol y triacilglicerol protege contra las enfermedades cardíacas? Las controversias centradas sobre el control dietético de los niveles de colesterol ilustran perfectamente la trampa en la que se cae cuando se intenta examinar demasiado detalladamente cada componente individual de la dieta en lugar de examinar la dieta en su conjunto. Por ejemplo, se pueden identificar al menos cuatro componentes que tienen efecto sobre el colesterol sérico: el propio colesterol, los **ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)**, los **ácidos grasos saturados (SFA)** y la **fibra**. Parecería normal que cuanto más colesterol ingiriese un individuo, mayor fuese el colesterol sérico. Sin embargo, la síntesis del colesterol está regulada muy estrechamente, por lo que la disminución de colesterol de la dieta tiene relativamente poco efecto sobre los niveles séricos de colesterol (véase p. 750). Se puede obtener una reducción más significativa de los niveles de colesterol y de triacilglicerol aumentando la proporción PUFA/SFA en la dieta. Finalmente, algunas fibras vegetales, especialmente las hidrosolubles, parecen disminuir significativamente los niveles de colesterol.

Si bien diversas grasas pueden producir efectos espectaculares en la dieta, los mecanismos bioquímicos de su acción son aún desconocidos. Las grasas saturadas inhiben la captación de LDL mediada por receptor, pero el mecanismo de este proceso es complejo. El ácido palmítico (C16, saturado) aumenta los niveles séricos de colesterol, mientras que el ácido esteárico (C18, saturado) ejerce un efecto neutro. Los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen los niveles de colesterol en las LDL y las HDL, mientras que el ácido oleico (C18, monoinsaturado) parece disminuir los niveles en las LDL sin afectar a los niveles de HDL. Es más, los ácidos grasos poliinsaturados ω-3 y ω-6 afectan de forma ligeramente distinta a los perfiles lipídicos (véase Apli. Clín. 26.6). No obstante, estas complejidades mecanísticas no afectan significativamente a las recomendaciones dietéticas. La mayoría de los alimentos ricos en grasas saturadas contienen los ácidos palmítico y esteárico y son aterogénicos. Como el ácido oleico disminuye los niveles de LDL, el aceite de oliva y, posiblemente, el de cacahuete, podrían ser considerados tan beneficiosos como los aceites poliinsaturados.

Existen pocas discrepancias respecto a estos datos. La cuestión es: ¿qué se puede hacer con esta información? Gran parte de los desacuerdos provienen de la tendencia a considerar cada factor dietético aisladamente. Por ejemplo, es discutible la cuestión de si vale la pena someter a un paciente a una dieta altamente restrictiva de 300 mg de colesterol (1 huevo = 213 mg de colesterol) si su colesterol sérico disminuye solamente en un 5–10%. Del mismo modo, el cambio de la **proporción PUFA/SFA** desde 0,3 (su valor normal) a 1,0 requeriría un cambio radical de la dieta, al eliminar los alimentos que contienen grasa saturada (principalmente carnes y grasas) o añadir grandes cantidades de grasas poliinsaturadas bastante desagradables al paladar. Para muchas personas esto sería imposible. La fibra constituye otro buen ejemplo de ello. Se podría esperar, como máximo, una disminución del 5% en el colesterol sérico por la adición de una cantidad razonable de fibra a la dieta. (Muy pocas personas serían capaces de comer las 10 manzanas diarias que se requieren para



APLICACIÓN CLÍNICA 26.6
Ácidos grasos poliinsaturados y factores de riesgo en la enfermedad cardíaca

Estudios recientes confirman que la reducción de los niveles séricos elevados de colesterol puede hacer disminuir el riesgo de enfermedad cardíaca. Estos estudios han renovado el interés por los efectos de la dieta sobre los niveles séricos de colesterol y otros factores de riesgo en la enfermedad cardíaca. Uno de los factores dietéticos más importantes en la regulación de los niveles de colesterol sérico es la relación entre grasas poliinsaturadas (PUFA) y grasas saturadas (SFA) de la dieta. Uno de los descubrimientos recientes más interesantes es el de que diferentes tipos de ácidos grasos poliinsaturados tienen efectos diferentes sobre el metabolismo lipídico y sobre otros factores de riesgo en la enfermedad cardíaca. Como ya se vio en la p. 698, existen dos familias de ácidos grasos poliinsaturados esenciales —la familia ω-6 o del linoleico, y la familia ω-3 o del linolénico. Estudios clínicos recientes han demostrado que los PUFA ω-6 (la fuente dietética principal es el ácido linoleico de plantas y aceites vegetales) hacen disminuir preferentemente los niveles séricos de colesterol, mostrando solamente leves efectos sobre los niveles séricos de triacilglicerol. Los PUFA ω-3 (la fuente dietética principal es el ácido icosapentaenoico de ciertos peces marinos y aceites de pescado) dan lugar a ligeros aumentos de los niveles de colesterol sérico y producen descensos significativos en los niveles séricos de triacilglicerol. No se conocen los mecanismos que subyacen detrás de estos efectos sobre los niveles séricos de lípidos.

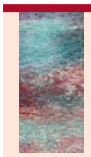
Los PUFA ω-3 todavía presentan otro efecto fisiológico único que puede hacer disminuir el riesgo de enfermedad cardíaca: disminuyen la agregación plaquetaria. El mecanismo de este efecto se conoce un poco mejor. Se sabe que el ácido araquidónico (familia ω-6) es un precursor del tromboxano A_2 (TXA_2), que es un potente agente agregante, y de la prostaglandina I_2 (PGI_2), el cual es un agente antiagregante débil (véase p. 766). Los PUFA ω-3 pueden, según se cree, actuar mediante uno de los dos mecanismos siguientes: (1) El ácido icosapentaenoico (familia ω-3) puede convertirse en tromboxano A_3 (TXA_3), que es sólo un agregante débil, y prostaglandina I_3 (PGI_3), que es un antiagregante fuerte. De este modo, el equilibrio entre agregación y antiagregación se decantaría hacia condiciones más antiagregantes, al desplazar los PUFA ω-3 a los PUFA ω-6 como fuente de precursores de tromboxanos y prostaglandinas. (2) Es posible que los PUFA ω-3 actúen por simple inhibición de la conversión de ácido araquidónico a TXA_2. Se está experimentando en numerosas pruebas clínicas con el potencial sin par que para la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca presenta el ácido icosapentaenoico y otros PUFA ω-3.

Holub, B. J. Dietary fish oils containing eicosapentaenoic acid and the prevention of atherosclerosis and thrombosis. *Can. Med. Assoc. J.* 139:377, 1988; Simopoulos, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:438, 1991; y Gapinski, J. P., Van Ruiswyk, J. V., Heudebert, G. R. y Schectman, G. S. Preventing restenosis with fish-oils following coronary angioplasty. A meta analysis. *Arch. Intern. Med.* 153:1595, 1993.

disminuir en un 15% el colesterol sérico.) ¿Tenemos que concluir, por tanto, que cualquier medio dietético para controlar los niveles de colesterol es inútil? Solamente si se considera aisladamente cada elemento de la dieta. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que los vegetarianos, que ingieren menos colesterol, tienen una relación PUFA/SFA más elevada y una mayor ingesta de fibra, pueden dar como promedio valores de colesterol inferiores en un 25–30% a los de los correspondientes a no vegetarianos. Quizá, de forma más realista, se ha demostrado que una modificación de la dieta aceptable para una persona media produce una disminución de un 10–15% en los niveles de colesterol en estudios a largo plazo. Un ensayo clínico de una duración de 7 años y subvencionado por los National Institutes of Health ha demostrado de manera concluyente que la reducción en los niveles séricos de colesterol reduce el riesgo de enfermedades cardíacas en el hombre. Aunque se haya alcanzado un consenso en cuanto a que la disminución de los niveles séricos de colesterol reduce el riesgo de enfermedades cardíacas, es importante recordar que el colesterol sérico es solamente uno de los muchos factores de riesgo cardiovascular.

Los efectos de los glúcidos refinados en la dieta son complejos

Gran parte de la controversia nutricional respecto la ingestión de glúcidos se centra en la cantidad de glúcidos refinados en la dieta. Hasta hace poco, a los azúcares sencillos (principalmente sacarosa) se les achacaba casi todos los males, desde la caries dental hasta las enfermedades cardíacas y la diabetes. En el caso de la caries dental, estas afirmaciones eran claramente correctas. Sin embargo, en el caso de las enfermedades cardíacas, la relación es más oscura (véase Apli. Clín. 26.7). La situación con respecto a la diabetes es probablemente aun menos directa. Mientras que la restricción de azúcares sencillos es a menudo deseable en pacientes que ya tienen diabetes, estudios recientes muestran una correlación menor a la esperada entre el tipo de glúcido ingerido y el consiguiente aumento de los niveles séricos de glucosa (Tabla 26.2). Los helados, por ejemplo, producen un aumento mucho menor en los niveles séricos de glucosa que las patatas o el pan integral. Esto es así porque otros componentes de la comida, tales como las proteínas, grasas y la fibra soluble, son mucho más importantes que el tipo de glúcido presente en la determinación de la velocidad a la que la glucosa entra en el torrente sanguíneo.



APLICACIÓN CLÍNICA 26.7

Adaptación metabólica: relación entre la ingesta de glúcidos y triacilgliceroles séricos

Cuando se evalúa la bibliografía sobre nutrición, es importante ser conscientes de la corta duración de la mayoría de los ensayos clínicos (entre 2 y 6 semanas), mientras que ciertas adaptaciones metabólicas pueden requerir períodos de tiempo considerablemente mayores. Así, incluso los estudios clínicos diseñados de forma aparentemente correcta pueden conducir a conclusiones erróneas que serán repetidas en la bibliografía popular durante los años venideros. Por ejemplo, existen diversos trabajos realizados entre 1960 y 1970 con el objeto de estudiar los efectos de una ingestión de glúcidos sobre el nivel de triacilglicerol sérico. Se aplicó a varones jóvenes de enseñanza secundaria una dieta en la que el 50% de las calorías procedentes de grasas fueron reemplazadas por sacarosa u otros azúcares simples durante un período de 2 a 3 semanas. En la mayoría de los casos, los niveles de triacilglicerol sérico aumentaron de forma ostensible (hasta un 50%). Ello condujo a la conclusión de que una ingesta elevada de azúcares simples, en particular de sacarosa, puede incrementar el riesgo de enfermedad cardíaca, noción que fue popularizada por textos de gran difusión sobre nutrición como Sugar Blues ("la tristeza del azúcar") y Sweet and Dangerous ("dulce y peligroso"). Por desgracia, mientras que las conclusiones iniciales eran difundidas en la prensa diaria, los propios experimentos empezaron a ser cuestionados. Estudios posteriores demostraron que si los experimentos proseguían durante períodos de tiempo mayores (3–6 meses), generalmente los niveles de triacilglicerol se normalizaban. Se desconoce la naturaleza de esta lenta adaptación metabólica.

Si bien la interpretación de los ensayos clínicos iniciales podía haber sido errónea, es posible que las recomendaciones dietéticas que de ellos derivan no fueran del todo incorrectas. En la dieta estadounidense muchos de los tentempiés y platos preparados son ricos en azúcares, grasas y densidad calórica. Así, la eliminación de alguna de estas comidas de la dieta puede colaborar en el control del peso, siendo el sobrepeso un factor que contribuye a la hipertriacilglicerolemia. Existen algunos individuos que manifiestan hipertriacilglicerolemia inducida por glúcidos. Los niveles de triacilglicerol en estos individuos responden de forma muy espectacular a dietas en las que se incluyen alimentos que contienen glúcidos complejos y fibras en lugar de otros que contengan principalmente azúcares simples como fuente de glúcidos.

Parks, E. J. y Hellerstein, M. K. Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:412, 2000.

La mezcla de proteínas de animales y vegetales satisface las necesidades nutricionales proteicas

Recientemente ha aparecido una preocupación sobre el tipo de proteína de la dieta. Los datos epidemiológicos y los estudios con animales sugieren que el consumo de proteínas de origen animal está relacionado con un aumento en la incidencia de las enfermedades cardíacas y de diversas formas de cáncer. Se podría suponer que la causa no sea probablemente la proteína animal por sí misma, sino la grasa y el colesterol asociados a la misma. ¿Qué tipo de proteínas deberíamos consumir? Aunque la dieta actual puede no ser óptima, una dieta estrictamente vegetariana no se-

TABLA 26.2 Índice glucémico[a] de algunos alimentos seleccionados

Productos de grano y cereal		Raíces y tubérculos	
Pan (blanco)	69 ± 5	Remolacha	64 ± 16
Pan (integral)	72 ± 6	Zanahorias	92 ± 20
Arroz (blanco)	72 ± 9	Patatas (blancas)	70 ± 8
Bizcocho	46 ± 6	Boniatos	48 ± 6
Cereales del desayuno		Legumbres secas	
Salvado	51 ± 5	Judías	29 ± 8
Copos de cereales	80 ± 6	Soja	15 ± 5
Copos de avena	49 ± 8	Guisantes (blackeye)	33 ± 4
Trigo molido	67 ± 10	Frutas	
Vegetales		Manzanas (golden)	39 ± 3
Maíz dulce	59 ± 11	Plátanos	62 ± 9
Guisantes congelados	51 ± 6	Naranjas	40 ± 3
Productos lácteos		Azúcares	
Helados	36 ± 8	Fructosa	20 ± 5
Leche (entera)	34 ± 6	Glucosa	100
Yogurt	36 ± 4	Miel	87 ± 8
		Sacarosa	59 ± 10

Fuente: Datos tomados de Jenkins, D. A., et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* 34:362, 1981.

[a]El índice glucémico se define como el área contenida en la curva de respuesta de glucosa para cada alimento expresada como porcentaje del área después de tomar la misma cantidad de glúcidos en forma de glucosa (media de 5–10 individuos).

ría aceptable para muchos habitantes de países desarrollados. Quizá lo mejor sea un término medio. Por supuesto, no se conocen riesgos para la salud asociados con una dieta mixta con un contenido de proteína animal menor que el de la actual dieta de los países desarrollados.

Es deseable un aumento en fibra procedente de diversas fuentes

A partir de los conocimientos actuales acerca de los efectos de la fibra en el metabolismo humano, la mayor parte de las recomendaciones sobre dietas saludables sugieren un aumento en el contenido en fibra de la dieta. La pregunta principal es: "¿Cuánta fibra es suficiente?" El contenido actual de la dieta estadounidense es de 14 a 15 g de fibra por día. La mayoría de los expertos creen que un aumento de hasta 25–30 g sería seguro y saludable. Como los distintos tipos de fibras juegan papeles fisiológicos diferentes, el aumento en la ingestión de fibra debería provenir de una amplia variedad de fuentes de fibra, incluyendo las frutas frescas, verduras y legumbres, así como las fuentes más comunes de fibra procedente de cereales (que son principalmente celulosa y hemicelulosa).

Las recomendaciones actuales abogan por una "dieta prudente"

En los últimos años, algunos grupos estadounidenses, tanto privados como gubernamentales, han propuesto recomendaciones específicas sobre la composición dietética ideal para el público. Este movimiento fue encabezado por el Senate Select Committee on Human Nutrition que publicó en primer lugar sus *Dietary Goals for the United States* en 1977. El Senate Select Committee recomendó a los estadounidenses que redujese el consumo de calorías totales, grasa total, grasa saturada, colesterol, azúcares sencillos y sal a objetivos "ideales" más compatibles con una buena salud (Figura 26.2). En los últimos años, el USDA (United States Department of Agriculture), la American Heart Association, la American Diabetes Association, el National Research Council y el Surgeon General han publicado recomendaciones similares, y el USDA ha utilizado estas recomendaciones para diseñar unas recomendaciones revisadas acerca de una dieta **equilibrada** o "**dieta prudente**" (Figura 26.3). ¿Es vá-

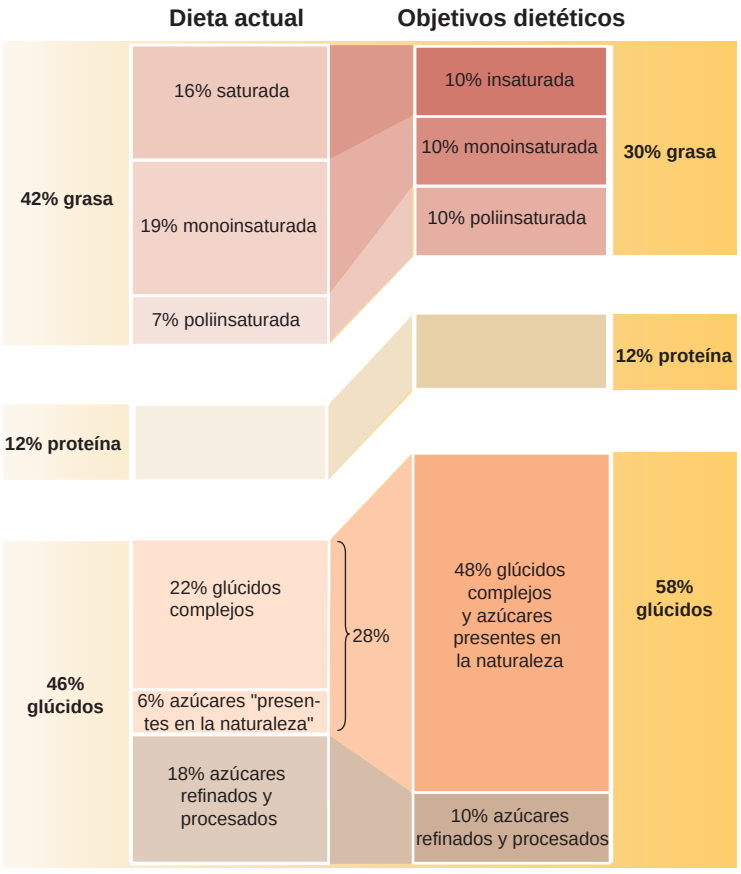


FIGURA 26.2
Objetivos dietéticos en los Estados Unidos.
Comparación gráfica de la composición de la dieta corriente en Estados Unidos y objetivos dietéticos para la población de los Estados Unidos sugerida por el Senate Select Committee on Human Nutrition.
Tomado de Dietary Goals for the United States, *2nd ed. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1977.*

lida la base científica de las recomendaciones para una dieta prudente? ¿Existen pruebas de que una dieta prudente haría mejorar la salud de la gente en general? Estas preguntas continúan siendo objeto de controversia.

Un argumento importante en contra de tales recomendaciones es que carecemos de información suficiente para establecer objetivos concretos. Podríamos estar generando algunos problemas mientras resolvemos otros. Por ejemplo, los objetivos de reducir la grasa total y la grasa saturada en la dieta se conseguirían de la mejor manera reemplazando la proteína animal por proteína vegetal. Esto podría reducir la cantidad de hierro y de vitamina B_{12} disponibles en la dieta. También está claro que el mismo conjunto de directrices no es válido para todos los individuos. Por ejemplo, se sabe que el ejercicio eleva el colesterol sérico de las HDL y que la obesidad eleva el colesterol y triacilglicerol séricos y reduce la tolerancia a la glucosa. Así, un individuo muy activo que mantiene el peso corporal ideal puede probablemente tolerar mayores ingestas de grasa y de azúcar que un individuo obeso.

Como "defensa", sin embargo, se puede aducir claramente que todas las directrices dietéticas se encuentran en la dirección correcta para reducir los factores de riesgo nutricionales en la población en general. Además, dietas parecidas han sido seguidas por nuestros antepasados y gente de otros países sin daño aparente. Sea cual sea el resultado de este debate en los años venideros, es seguro que conformará gran parte de nuestras ideas en lo que concierne al papel de la nutrición en medicina.

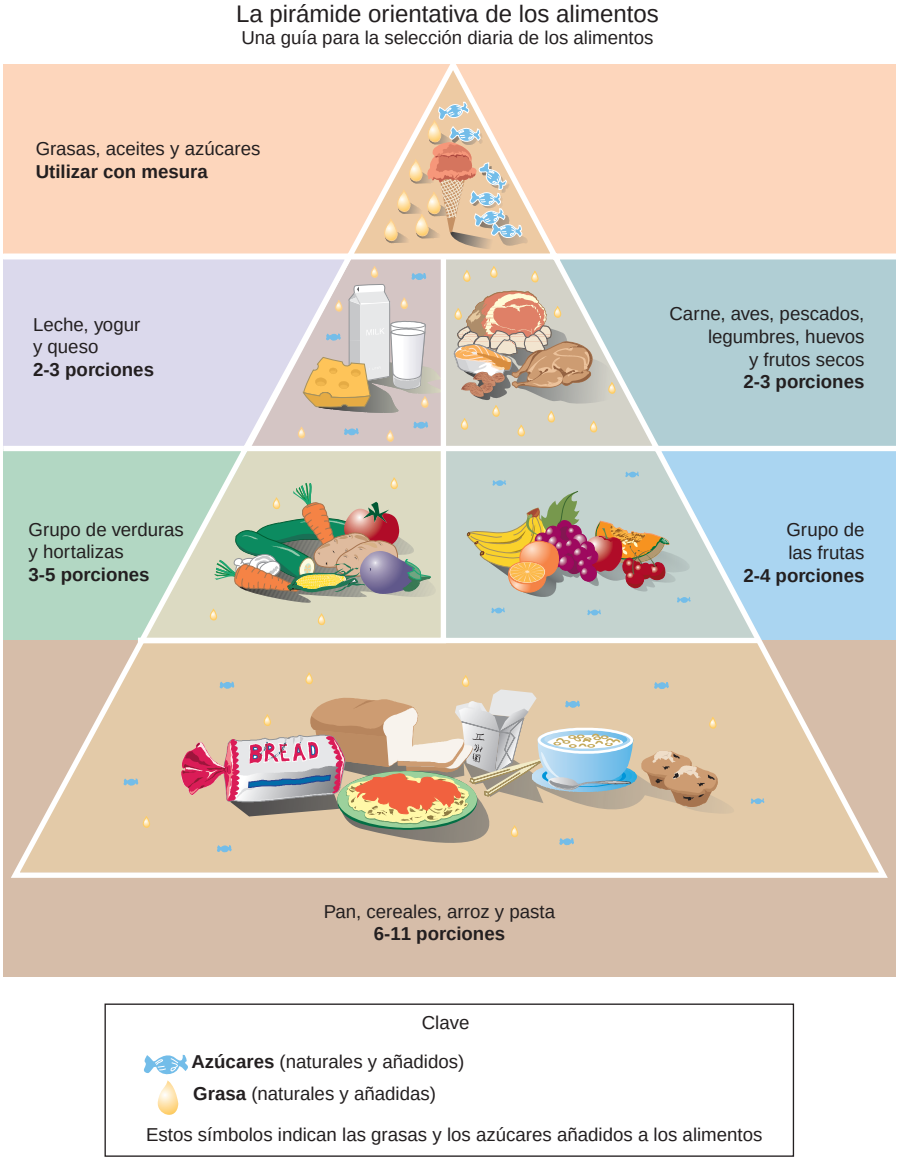


FIGURA 26.3
Pirámide alimentaria del USDA.
Representación gráfica de las recomendaciones del USDA sobre una dieta equilibrada.
HG Bulletin #252. *Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1992.*

BIBLIOGRAFÍA

Malnutrición energética y proteica en pacientes hospitalizados

The Veterans Affairs Total Parenteral Nutrition Cooperative Study Group. Perioperative total parenteral nutrition in surgical patients, *N. Engl. J. Med.* 325:525, 1991.

Consecuencias metabólicas de la obesidad

Maxwell, M. H. y Waks, A. U. Obesity and hypertension. *Bibl. Cardiol.* 41:29, 1987.

Simopoulos, A. P. Obesity and carcinogenesis: historical perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:271, 1987.

Pi-Sunyer, F. X. Health implications of obesity *Am. J. Clin. Nutr.* 53:15955, 1991

Boden, G. Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111, 241, 1999.

Hotamisligii, G. S. The role of TNFα and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. Intern. Med.* 245:621, 1999.

Predisposición metabólica a la obesidad

Bjorntorp, P. Fat cell distribution and metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 499:66, 1987.

Bray, G. A. Obesity—a disease of nutrient or energy balance? *Nutr. Rev.* 45:33, 1987.

Dulloo, A. G. y Miller, D. S. Obesity: a disorder of the sympathetic nervous system. *World Rev. Nutr. Diet.* 50:1, 1987.

Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K. y Friedman, J. M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543, 1995.

Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. y Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546, 1995.

Glúcidos complejos y fibras

Anderson, J. W. Fiber and health: an overview. *Am. J. Gastroenterol.* 81:892, 1986.

Eastwood, M. Dietary fiber and the risk of cancer. *Nutr. Rev.* 45:193, 1987.

Shankar, S. y Lanza, E. Dietary fiber and cancer prevention. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 5:25, 1991.

Wolever, T. M. S., Jenkins, D. J. A., Jenkins, A. L. y Josse, R. G. The glycemic index: methodology and clinical implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:846, 1991.

Miller, J. C. B. Importance of glycemic index in diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 59(suppl.):747S, 1994.

Composición de macronutrientes y salud

Gorlin, R. The biological actions and potential clinical significance of dietary ω-3 fatty acids. *Arch. Intern. Med.* 148:2043, 1988.

Grundy, S. M. Monounsaturated fatty acids, plasma cholesterol, and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:1168, 1987.

Kisselbah, A. y Schetman, G. Polyunsaturated and saturated fat, cholesterol, and fatty acid supplementation. *Diabetes Care* 11:129, 1988.

Kritchevsky, D. y Klurfeld, D. M. Caloric effects in experimental mammary tumorigenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:236, 1987.

Welsh, C. W. Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:191, 1987.

Rasmussen, O. W., Thomsen, C., Hansen, K. W., Vesterland, M., Winther, E. y Hermansen, K. Effects on blood pressure, glucose, and lipid levels of a high monounsaturated fat diet compared with a high-carbohydrate diet in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 16:156S, 1993.

Gardener, C. D. y Kraemer, H. C. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids. *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.* 15:1917, 1995.

Simopoulus, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:438, 1991.

Berry, E. M. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 66:991S, 1997.

Nicholson, A. S., Sklar, M., Barnard, N. D., Gore, S., Sullivan, R. y Browning, S. Toward improved management of NIDDM: a randomized, controlled, pilot intervention using a low fat, vegetarian diet. *Prev. Med.* 29:87, 1999.

Recomendaciones dietéticas

American Heart Association. *Recommendations for Treatment of Hyperlipidemia in Adults.* Dallas: American Heart Association. 1984.

Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences. *Towards Healthful Diets.* Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1980.

National Research Council. *Diet, Nutrition and Cancer.* Washington: National Academy Press, 1982.

Senate Select Committee on Human Nutrition. *Dietary Goals for the United States,* 2nd ed, Stock No. 052-070-04376-8. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1977.

Truswell, A. S. Evolution of dietary recommendations, goals, and guidelines. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:1060, 1987.

U.S. Department of Agriculture. *Nutrition and Your Health, Dietary Guidelines for Americans.* Stock No. 017-001-00416-2. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1980.

U.S. Department of Health and Human Services. *The Surgeon General's Report on Nutrition and Health.* Stock No. 017-001-00465-1. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1988.

U.S. Department of Agriculture. *The Food Guide Pyramid.* Stock No. HSG-252. Hyatsville, MD: Human Nutrition Information Service, 1992.

PREGUNTAS C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. De dos personas con aproximadamente el mismo peso, la que tenga más altas necesidades energéticas basales será probablemente:
   A. la más alta.
   B. la hembra si la otra es macho.
   C. la de más edad.
   D. la persona sometida a menos estrés.
   E. todas las anteriores.

2. El índice metabólico basal:
   A. no está influido por la ingesta de energía.
   B. aumenta en respuesta al ayuno.
   C. puede disminuir hasta un 50% durante períodos de ayuno.
   D. aumenta en proporción directa con el gasto energético diario.
   E. no responde a cambios en los niveles hormonales.

3. El efecto primario del consumo de proteína en exceso sobre las necesidades corporales inmediatas será:
   A. la excreción del exceso de proteína en la orina.
   B. un aumento en el "almacén" de proteínas.
   C. un aumento en la síntesis de proteínas musculares.
   D. un aumento en la cantidad de proteínas circulantes en el plasma.
   E. un aumento en la cantidad de tejido adiposo.

4. ¿Cuál de los individuos siguientes estaría con más probabilidad en equilibrio de nitrógeno?
   A. un hombre adulto normal.
   B. una mujer normal embarazada.
   C. un niño en edad de crecimiento.
   D. un hombre adulto que se recupera de una operación quirúrgica.
   E. una mujer normal que toma una dieta con muy bajo contenido proteico.

5. El kwashiorkor es:
   A. la forma más común de desnutrición de proteínas y calorías en los Estados Unidos.
   B. un estado que se caracteriza por una apariencia magra y gastada.
   C. una ingesta inadecuada de un alimento de cualquier tipo.
   D. una ingesta adecuada de calorías totales, con una deficiencia específica en proteínas.
   E. una ingesta adecuada de proteína total, con deficiencia en aminoácidos esenciales.

6. Una ingesta excesiva de calorías:
   A. no suele dar lugar a consecuencias metabólicas adversas.
   B. da lugar a cambios metabólicos que suelen ser irreversibles.
   C. se asocia frecuentemente con un aumento de los niveles séricos de los ácidos grasos libres, colesterol y triacilgliceroles.
   D. se asocia frecuentemente con un aumento en el número de receptores de insulina.
   E. es el único componente de la obesidad.

7. El hecho de reemplazar completamente las proteínas animales de la dieta por proteínas vegetales:
   A. no se esperaría que tuviese efecto sobre la dieta en general.
   B. reduciría la cantidad de alimento total consumido para obtener el mismo número de calorías.
   C. podría reducir la cantidad total de hierro y vitamina B_{12} disponibles.
   D. sería satisfactoria independientemente de la naturaleza de la proteína vegetal utilizada.
   E. podría no satisfacer las necesidades de proteína.

8. La grasa de la dieta:
   A. normalmente se encuentra presente, aunque no existe una necesidad específica de la misma.
   B. si se encuentra presente en exceso, se puede almacenar como glucógeno o como triacilgliceroles del tejido adiposo.
   C. debería incluir los ácidos linoleico y linolénico.
   D. en un programa de entrenamiento debería ir incrementándose para aumentar los almacenes de energía del cuerpo.
   E. no suele dar problemas de salud si se encuentra presente en exceso.

9. ¿Cuál o cuáles de las siguientes afirmaciones acerca de la fibra de la dieta son correctas?
   A. la fibra hidrosoluble ayuda a disminuir el colesterol sérico en la mayoría de la gente.
   B. las fibras mucilaginosas disminuyen la velocidad de digestión y absorción de glúcidos.
   C. la fibra insoluble aumenta el volumen de las heces y disminuye el tiempo de tránsito.
   D. todas las anteriores son correctas.
   E. ninguna de las anteriores es correcta.

10. ¿Cuál de los siguientes regímenes dietéticos sería *más* efectivo en la disminución del colesterol sérico?
    A. restricción del colesterol de la dieta.
    B. aumento de la relación entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados.
    C. aumento en el contenido en fibra.
    D. restricción en el colesterol y aumento en la cantidad de fibra.
    E. restricción en la toma de colesterol, aumento en la relación PUFA/SFA, aumento en la cantidad de fibra.

Preguntas 11 y 12: Un hombre joven ha sufrido quemaduras de tercer grado en gran parte del cuerpo y ha sido hospitalizado con un estado catabólico severo. Un individuo en este estado requiere aproximadamente 40 kcal kg^{-1} $día^{-1}$ y 2 g kg^{-1} $día^{-1}$ de proteína para mantener un balance calórico y de nitrógeno positivos. Este hombre joven pesa 64 kg. Se inicia nutrición parenteral total (TPN) con una solución que contiene 20% de glucosa y 4,25% de aminoácidos (la proteína se suministra de esta forma).

11. Si se infunden 3000 g de solución por día:
    A. el paciente no recibiría suficiente proteína.
    B. las calorías suministradas serían inadecuadas.
    C. tanto la proteína como las calorías serían las adecuadas para satisfacer las necesidades.
    D. es demasiada proteína infundida.

12. En pacientes con TPN, a veces se infunde también una solución lipídica. En el caso de este hombre joven, el objetivo de la solución lipídica sería:
    A. suministrar calorías adicionales para satisfacer las necesidades calóricas.
    B. suministrar ácidos grasos esenciales.
    C. hacer la mezcla más apetitosa.
    D. suministrar fibra.
    E. asegurar un suministro adecuado de colesterol para la construcción de membranas.

Preguntas 13 y 14: Durante muchos años, la American Diabetic Association recomendó para los diabéticos una dieta rica en glúcidos complejos y fibra, y baja en grasas. Más tarde se vio que a algunos individuos esta dieta no les iba tan bien como una dieta rica en ácidos grasos monoinsatuados. Desde 1994, la ADA ha abandonado el concepto de dieta única para diabéticos y actualmente recomienda centrarse en alcanzar los objetivos de glucosa, lípidos y presión sanguínea, con una reducción de peso si es necesario.

13. ¿Cuál o cuáles de las siguientes afirmaciones son correctas?
    A. una dieta rica en glúcidos y fibra produce a menudo una reducción de peso significativa, ya que tiene una densidad calórica menor que una dieta rica en grasas.
    B. una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados sería la más apropiada para un diabético con sobrepeso.
    C. el objetivo para los lípidos es reducir los niveles en sangre de todas las lipoproteínas.
    D. la obesidad agrava la diabetes porque inhibe la producción de insulina por parte del páncreas.
    E. todas las anteriores son correctas.

14. En los diabéticos:
    A. el único glúcido que se debe eliminar de la dieta es la sacarosa.
    B. la fibra aumenta la velocidad de digestión y absorción de los glúcidos.
    C. no todos los alimentos glucídicos aumentan los niveles de glucosa en sangre a la misma velocidad, ya que el índice glucémico no es el mismo para todos los alimentos.
    D. en los que normalmente se controlan bien, el estrés no tendrá efecto sobre los niveles de azúcar en la sangre.
    E. una dieta vegetariana es la única elección apropiada.

Problemas

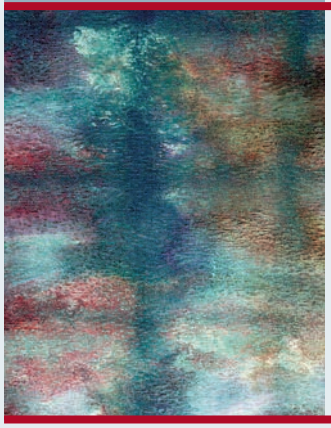
15. Calcular el número de gramos de glúcidos, lípidos y proteínas que debería consumir una persona que sigue una dieta de 2300 kcal para cumplir con las pautas establecidas por el Senate Select Committee on Human Nutrition. Suponiendo que el individuo pesa 81,8 kg (180 lb) y que la proteína proviene de fuentes animales y vegetales, con un 75% de eficiencia de utilización, ¿la cantidad de proteína calculada anteriormente satisface la cantidad de proteína recomendada?

16. Una mujer de 54,8 kg de peso (120 lb) consume una dieta con un total de calorías adecuado y 44 g de proteínas por día. La proteína proviene exclusivamente de fuentes vegetales, basada principalmente en maíz. ¿Cuál sería el estado de su balance de nitrógeno?

RESPUESTAS

1. **A** Una persona más alta con el mismo peso tendría una mayor área superficial. B: Los hombres tienen mayores necesidades energéticas que las mujeres. C: Las necesidades energéticas disminuyen con la edad. D: El estrés, probablemente a causa de los efectos de la adrenalina y el cortisol hace aumentar las necesidades energéticas.
2. **C** Este es parte del mecanismo de supervivencia durante el ayuno. A, B: El IMB disminuye cuando lo hace la ingesta de energía. D: El IMB, tal como se define, es independiente del gasto energético. Sólo cuando el ejercicio se repite siguiendo una pauta diaria, de modo que aumenta la masa del músculo magro, aumenta también el IMB. E: Muchas hormonas aumentan el IMB.
3. **E** El exceso de proteína se trata como cualquier otro exceso de fuentes de energía y se almacena (sin el nitrógeno) finalmente como grasa del tejido adiposo. A: En la orina normal no se encuentra proteína, excepto en cantidades muy pequeñas. El exceso de nitrógeno se excreta en forma de NH_4^+ y urea, mientras que el exceso de esqueletos carbonados de los aminoácidos se utiliza como fuente de energía. B–D: No existe una forma de almacenamiento discreto de proteína y, aunque puede consumirse algo de músculo y proteína estructural, no existen pruebas de que un aumento en la ingestión dé lugar a un aumento generalizado en la síntesis de proteínas.
4. **A** B–D: A pesar de que es un estado normal, el embarazo es también un período de crecimiento, con lo que necesita un balance positivo, como los períodos de convalecencia. E: Una ingestión inadecuada de proteínas da lugar a un balance negativo.
5. **D** Ésta es la definición. A: La malnutrición de proteínas y calorías más común se da en pacientes hospitalizados gravemente enfermos, que son más propensos a padecer malnutrición generalizada. B, C: Estas son las características del marasmo. E: Daría lugar a balance negativo de nitrógeno, pero no posee un nombre específico.
6. **C** Probablemente a causa de un incremento en el número y/o en el tamaño de los adipocitos, existirá un número menor de receptores de insulina o recptores insensibles. A: La ingestión excesiva de calorías daría lugar a obesidad si se continuara durante un tiempo suficientemente largo. B: Afortunadamente, la mayor parte de los cambios que acompañan a la obesidad pueden revertirse si se pierde peso. D: Muchos de los efectos adversos de la obesidad se asocian con un incremento en el número de adipocitos deficientes en receptores de insulina o con receptores insensibles. E: La falta de ejercicio y factores genéticos también intervienen en la obesidad.
7. **C** A, C: Esto reduciría la cantidad de grasa, especialmente grasa saturada, pero reduciría también la cantidad de nutrientes necesarios que provienen principalmente de fuentes animales. B: El contenido proteico de los vegetales es bastante bajo, por lo que deberían consumirse mayores cantidades de vegetales. D, E: Es posible satisfacer las necesidades de aminoácidos esenciales completamente, si se consumen vegetales con composiciones complementarias de aminoácidos y en las cantidades adecuadas.
8. **C** A, C: Los ácidos linoleico y linolénico son ácidos grasos esenciales y deben estar presentes en la dieta. B, D: El exceso de glúcidos se puede almacenar como grasa, pero no es posible la inversa. D: Se ha comprobado que la carga de glúcido hace aumentar la resistencia física. E: Las dietas ricas en grasa se relacionan con muchos riesgos para la salud.
9. **D** Todas ellas ilustran los distintos papeles y propiedades de los tipos más comunes de fibra.
10. **E** Cualquiera de estas medidas podría por sí sola hacer disminuir ligeramente los niveles de colesterol sérico, pero son necesarias las tres juntas para obtener una reducción de más del 15%.
11. **C** Esta cantidad de solución aportaría 128 g de proteína y 2900 kcal (2400 de la glucosa y 512 de los aminoácidos), ambas cantidades son suficientes para satisfacer las necesidades establecidas.
12. **B** Los pacientes con TPN necesitan un aporte de ácidos grasos esenciales. A: La solución original aporta las calorías adecuadas, aunque un aporte adicional de calorías no debería perjudicar a este hombre joven. C: El paciente no está sintiendo el sabor de esta mezcla, de modo que es irrelevante que ésta sea más apetitosa. D: La fibra se suministra a través de fuentes de gúcidos complejos. E: El cuerpo puede fabricar su propio colesterol.
13. **A** Como los gúcidos tienen menos de la mitad de la densidad calórica de las grasas y la fibra no aporta calorías, esta dieta tiene una densidad calórica baja. B: Mucha grasa tendería a aumentar el peso. C: El objetivo es reducir los niveles de LDL y VLDL, pero no el nivel de HDL. E: El problema es que los factores liberados por las células adiposas producen resistencia a la insulina.
14. **C** Los índices glucémicos de los alimentos varían mucho. El pan y el arroz aumentan los niveles de glucosa en la sangre más rápidamente que la sacarosa. A: Véase C. B: Una de las ventajas de la fibra es que disminuye la velocidad de absorción de los glúcidos. D: El estrés aumenta la glucosa en sangre de todo el mundo, a causa de la liberación de adrenalina y glucocorticoides. E: Una dieta vegetariana bien diseñada es perfectamente aceptable, pero, ciertamente, no es la única posibilidad.
15. De acuerdo con las pautas del SSCHN, una dieta de 2300 kcal consistiría en 333,5 g de glúcidos (como máximo 57,5 g de azúcares simples), 69 g de proteínas y 76,7 g de grasas (como máximo 25,6 g de grasas saturadas). Para un hombre que pesa 81,8 kg (180 lb), 81,8 kg por 0,8 g kg^{-1} = 65,5 g de proteínas por día para satisfacer las necesidades. El doce por ciento de 2300 kcal aporta suficiente proteína.
16. 44 g de proteínas/54,8 kg es 0,8 g de proteínas kg^{-1} $día^{-1}$. No obstante, esto es inadecuado porque la proteína vegetal pura tiene una eficiencia de utilización menor del 75%. Además, una gran dependencia de una sola proteína (el maíz es deficitario en lisina) conduciría probablemente a una deficiencia de uno o más aminoácidos esenciales. Por lo tanto, esta mujer tiene un balance de nitrógeno negativo.

27



PRINCIPIOS DE NUTRICIÓN II: MICRONUTRIENTES

Stephen G. Chaney

27.1 VISIÓN GENERAL 1138

27.2 EVALUACIÓN DE LA MALNUTRICIÓN 1138

27.3 INGESTAS DIETÉTICAS DE REFERENCIA 1138

27.4 VITAMINAS LIPOSOLUBLES 1139

La vitamina A procede de carotenoides vegetales 1139
La síntesis de vitamina D en el organismo requiere luz solar 1141
La vitamina E es una mezcla de tocoferoles 1144
La vitamina K es un derivado de quinona 1146

27.5 VITAMINAS HIDROSOLUBLES 1148

27.6 VITAMINAS HIDROSOLUBLES LIBERADORAS DE ENERGÍA 1148

La tiamina (vitamina B_1) forma el coenzima tiamina pirofosfato (TPP) 1148
La riboflavina forma FAD y FMN 1150
El ácido nicotínico forma los coenzimas NAD y NADP 1151
La piridoxina (vitamina B_6) forma el coenzima piridoxal fosfato 1151
El ácido pantoténico y la biotina forman coenzimas involucrados en el metabolismo energético 1153

27.7 VITAMINAS HIDROSOLUBLES HEMATOPOYÉTICAS 1154

El ácido fólico (folacina) actúa en forma de tetrahidrofolato en el metabolismo monocarbonado 1154
La vitamina B_{12} (cobalamina) contiene cobalto dentro de un anillo tetrapirrólico 1156

27.8 OTRAS VITAMINAS HIDROSOLUBLES 1157

El ácido ascórbico participa en reacciones de reducción e hidroxilación 1157
La colina realiza muchas funciones en el cuerpo 1159

27.9 MACROMINERALES 1159

El calcio desempeña numerosas funciones fisiológicas 1159
El magnesio es necesario para muchos enzimas 1161

27.10 OLIGOELEMENTOS 1161

El hierro se reutiliza eficientemente 1161
El yodo se incorpora en las hormonas tiroideas 1162
El zinc es un cofactor de muchos enzimas 1162
El cobre es un cofactor de enzimas importantes 1163
El cromo es un componente de la cromodulina 1163
El selenio es un eliminador de peróxidos 1163
El manganeso, el molibdeno, el fluoruro y el boro también son importantes 1164

27.11 LA DIETA ESTADOUNIDENSE: HECHOS Y FALACIAS 1164

27.12 EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA 1164

BIBLIOGRAFÍA 1166

PREGUNTAS 1167

RESPUESTAS 1168

APLICACIONES CLÍNICAS

27.1 Consideraciones nutricionales en la fibrosis quística 1142
27.2 Osteodistrofia renal 1143
27.3 Consideraciones nutricionales para el recién nacido 1147
27.4 Fármacos anticonvulsivos y necesidades vitamínicas 1148
27.5 Consideraciones nutricionales para los alcohólicos 1150
27.6 Necesidades de vitamina B_6 para los consumidores de contraceptivos orales 1153
27.7 Polimorfismos genéticos y necesidad de ácido fólico 1155
27.8 Dieta y osteoporosis 1160
27.9 Requerimientos nutricionales en personas de edad avanzada 1165

27.1 VISIÓN GENERAL

Los micronutrientes juegan un papel vital en el metabolismo humano, ya que intervienen en casi todas las reacciones y rutas bioquímicas conocidas. No obstante, la bioquímica de estos nutrientes tiene poco interés, salvo que haya probabilidad de carencias en la dieta. Sin duda, la dieta estadounidense actual es la mejor que ha habido nunca. El actual suministro de comestibles proporciona una abundante variedad de alimentos durante todo el año, por lo que las enfermedades carenciales se han transformado en curiosidades médicas. Sin embargo, esta dieta está lejos de ser óptima. El viejo dicho de que se puede obtener cualquier cosa que se necesite a partir de una dieta equilibrada sólo es cierto si se sigue una dieta equilibrada. Desgraciadamente, muchos estadounidenses no consumen una dieta equilibrada. Alimentos con alto contenido calórico y baja densidad nutritiva (a menudo denominados "calorías vacías" o "comida basura") constituyen una parte abundante y popular de la dieta estadounidense y el estado nutricional de los consumidores de esta dieta se ve afectado por la elección de tales alimentos. Por tanto, es obvio que no están justificadas ni la alarma ni la indolencia. Es preciso evaluar de la forma más adecuada la corrección de la dieta.

27.2 EVALUACIÓN DE LA MALNUTRICIÓN

Existen tres criterios cada vez más estrictos para medir la **malnutrición**.

1. Los **estudios de ingestión de la dieta**, basados habitualmente en un registro de 24 horas, son los menos estrictos. Los registros de 24 horas tienden a sobreestimar el número de personas con dietas deficientes. Además una ingestión dietética escasa no es normalmente por sí sola un problema en Estados Unidos, a menos que esté combinada con unas necesidades nutricionales superiores.
2. Los **ensayos bioquímicos**, directos o indirectos, constituyen un indicador más útil del estado nutricional de un individuo. En el mejor de los casos, pueden indicar **carencias nutricionales subclínicas**, tratables antes de que se manifieste la enfermedad carencial real. Sin embargo, no todos los ensayos bioquímicos son igualmente válidos, hecho desafortunado que no se reconoce suficientemente. Los cambios en los parámetros bioquímicos debidos al estrés han de interpretarse con prudencia. La distribución corporal de muchos nutrientes cambia de forma espectacular en una situación de estrés tal como enfermedad, lesión corporal o embarazo. Una disminución de un nutriente determinado en un compartimiento tisular (normalmente la sangre) no indica necesariamente una carencia o un aumento de las necesidades nutricionales. Podría reflejar, sencillamente, un ajuste metabólico normal al estrés.
3. El criterio más estricto es la aparición de **síntomas clínicos**. Sin embargo, sería deseable intervenir mucho antes de que éstos se manifiesten.

La pregunta sigue siendo la misma: ¿En qué momento debe interpretarse que las encuestas dietéticas o los análisis bioquímicos indican la necesidad de intervenir en la nutrición? Son útiles las siguientes directrices generales. Las encuestas dietéticas son raramente válidas para indicar una malnutrición general, a no ser que la ingestión media de un grupo de población sea significativamente inferior a la Necesidad Media Estimada (EAR, Estimated Average Requirement) para uno o más nutrientes. No obstante, examinando el porcentaje de individuos con ingesta subóptima dentro de una población, es posible identificar grupos de riesgo elevado que tendrían que ser controlados más cuidadosamente. Los ensayos bioquímicos pueden indicar casos subclínicos de malnutrición en los que sea deseable una intervención a nivel de nutrición, siempre que (a) se demuestre la validez del ensayo, (b) pueda verificarse la carencia mediante un segundo ensayo y (c) no exista una situación de estrés poco habitual que pueda modificar la distribución de micronutrientes. Cuando se evalúa un estado nutricional, es importante que el médico tenga en cuenta la existencia de grupos de riesgo, los ensayos bioquímicos para controlar los estados de nutrición de la forma más fiable, y los síntomas de las carencias que se puedan dar.

27.3 INGESTAS DIETÉTICAS DE REFERENCIA

Las **ingestas dietéticas de referencia** (**DRI**, Dietary Reference Intakes) son estimaciones cuantitativas de las ingestas de nutrientes que hay que tener en cuenta al di-

señar y evaluar dietas para personas sanas. Para evaluar los patrones cuantitativos de la ingesta de nutrientes, el Food and Nutrition Board del National Research Council tiene en cuenta la cantidad de nutrientes y componentes de los alimentos que son necesarios para evitar las enfermedades carenciales y, cuando los datos son definitivos, para promover una salud óptima. El primer paso de este proceso consiste en determinar la **Necesidad Media Estimada (EAR)**, estimación de la cantidad de nutriente que satisface la necesidad de nutriente en la mitad de un grupo de individuos sanos con un estilo de vida y un sexo determinado. La **Asignación Dietética Recomendada** (**RDA,** Recommended Dietary Allowance) se establece normalmente en 2 desviaciones estándar por encima de la EAR y se supone que es la cantidad de ingesta dietética suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales de casi todos (97–98%) los individuos sanos de un grupo. Si se considera que un nutriente es esencial pero los datos experimentales se consideran inadecuados para determinar una EAR, se establece en su lugar una **ingestión adecuada** (**AI,** adequate intake). La AI se basa en aproximaciones, determinadas mediante observación o experimentalmente, de la ingesta de nutriente en un grupo de individuos. Por ejemplo, la AI para lactantes se basa en la ingesta de nutrientes media diaria suministrada por la leche humana para lactantes sanos, no prematuros que se alimentan exclusivamente del pecho. Por último, el Food and Nutrition Board establece un Nivel de Ingestión Máxima Tolerable (UL, Tolerable Upper Intake Level) para la mayoría de nutrientes. El UL se define como el nivel más elevado de ingestión de nutriente diaria que probablemente no representa un riesgo de efectos adversos para la salud de casi todos los individuos de la población general. Las RDA, las AI y los UL se han ideado para su uso en la planificación y evaluación de dietas para individuos. Las EAR se han planteado para su uso en el establecimiento de los objetivos de ingestión de nutrientes y para la evaluación de la prevalencia de una ingestión inadecuada en un grupo de la población.

Estas determinaciones son relativamente fáciles de realizar en el caso de los nutrientes asociados a enfermedades carenciales espectaculares, como es el caso de la vitamina C y el escorbuto. En otros casos se han de utilizar medidas más indirectas, tales como saturación de tejidos o extrapolación a partir de estudios con animales. No existe un conjunto único de criterios que pueda utilizarse para todos los micronutrientes, por lo que siempre existe cierta incertidumbre y debate respecto a cuáles son los criterios correctos. Los criterios se adaptan constantemente a las nuevas investigaciones. El Food and Nutrition Board se reúne normalmente cada 6–10 años para considerar la información disponible en el momento y, actualizar sus recomendaciones.

Las RDA sirven de guía general útil para evaluar la idoneidad de dietas individuales. No obstante, las RDA tienen varias limitaciones que deberían tenerse presentes. Las más importantes son las siguientes:

1. Las RDA se diseñaron para satisfacer las necesidades de individuos sanos, por lo que no tienen en cuenta necesidades específicas debidas a infecciones, alteraciones metabólicas o enfermedades crónicas.
2. Dado que los conocimientos actuales sobre las necesidades nutricionales son incompletos, pueden existir necesidades nutricionales por determinar. Para cubrir estas necesidades, las RDA deberían alcanzarse con una selección de alimentos lo más variada posible. Ningún alimento por sí mismo se puede considerar completo, aunque satisfaga las RDA de todos los nutrientes conocidos. Ésta es una consideración importante, especialmente en vista de la práctica actual de reforzar alimentos que de lo contrario serían de valor nutricional bajo.
3. Con su formulación actual, las RDA no definen el nivel "óptimo" de ningún nutriente, dado que los niveles óptimos son de difícil definición. Debido a informaciones que sugieren que la ingestión óptima de ciertos micronutrientes (p. ej., vitaminas A, C y E) puede disminuir las enfermedades cardíacas y el riesgo de cáncer, recientemente se han aumentado ligeramente las RDA de estos nutrientes. No obstante, algunos expertos creen que las RDA actuales podrían ser insuficientes para promover una salud óptima.

27.4 VITAMINAS LIPOSOLUBLES

La vitamina A procede de carotenoides vegetales

Las formas activas de la **vitamina A** son el **retinol**, el **retinal (retinaldehído)** y el **ácido retinoico**. Estos precursores son sintetizados por las plantas en forma de **carotenoides** (Figura 27.1), que son escindidos en retinol por la mayoría de los ani-

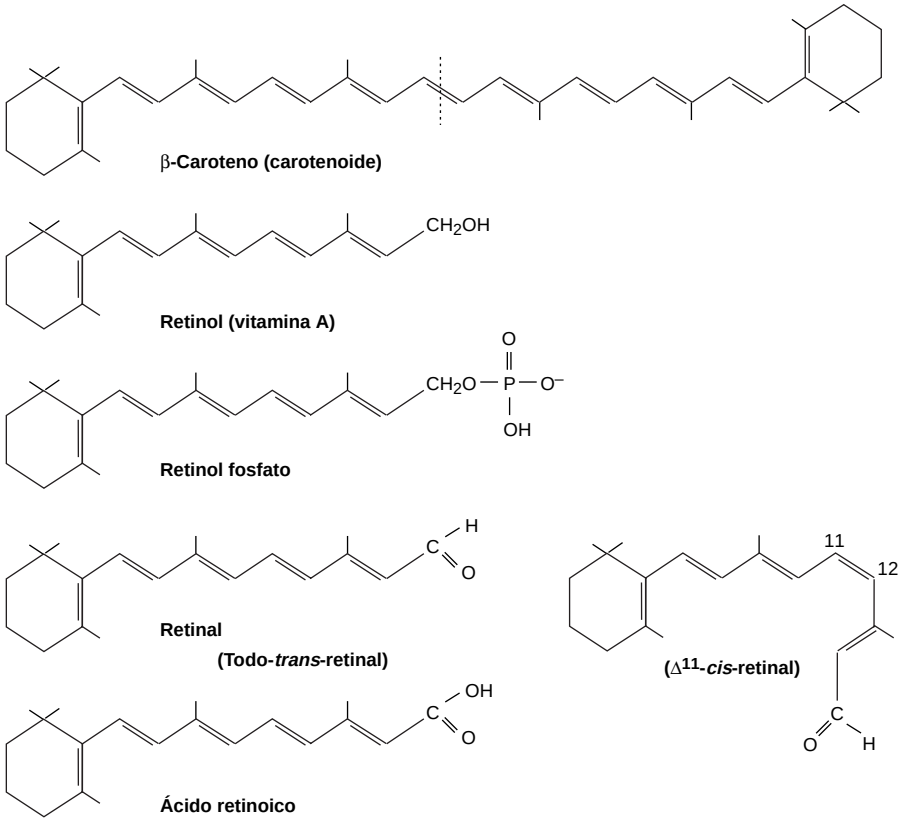


FIGURA 27.1
Estructuras de la vitamina A y compuestos relacionados.

males y se almacenan en el hígado en forma de palmitato de retinol. El hígado, la yema de huevo, la mantequilla y la leche entera son buenas fuentes de retinol preformado. Las verduras de color verde oscuro o amarillas son, generalmente, buenas fuentes de carotenoides. La conversión de los carotenoides en retinol raramente alcanza el 100%, por lo que la potencia en vitamina A de los distintos alimentos se expresa en términos de equivalentes de retinol (1 ER es igual a 1 mg de retinol, 6 mg de **β-caroteno** y 12 mg de otros carotenoides). El β-caroteno y otros carotenoides son las fuentes principales de vitamina A en la dieta estadounidense. En el cuerpo, estos carotenoides se escinden primero en retinol y a continuación se convierten en otros metabolitos de la vitamina A (Figura 27.1).

La vitamina A realiza una serie de funciones en el cuerpo. Ha hecho falta esperar hasta los últimos años para comprender bien sus aspectos bioquímicos (Figura 27.2). El β-caroteno y algunos otros carotenoides juegan un papel importante como **antioxidantes**. En las condiciones de baja presión de oxígeno que predominan en el cuerpo, el β-caroteno es un antioxidante muy efectivo, por lo que podría reducir el riesgo de los tipos de cáncer iniciados por radicales libres y otros oxidantes fuertes. Varios estudios epidemiológicos han sugerido que una cantidad adecuada de β-caroteno en la dieta puede ser importante para la reducción del riesgo de cáncer de pulmón, especialmente en personas que fuman. Sin embargo, según dos estudios prospectivos llevados a cabo en múltiples centros, un suplemento de β-caroteno no proporciona beneficios detectables, pudiendo incluso aumentar el riesgo de cáncer en los fumadores. Esto demuestra el peligro de hacer recomendaciones dietéticas basadas únicamente en estudios epidemiológicos.

El retinol se convierte en el cuerpo en **retinil fosfato**. El retinil fosfato parece actuar como **dador de glucosilos** en la síntesis de algunas glucoproteínas y mucopolisacáridos, de un modo muy parecido al del dolicol fosfato (véase p. 259). El retinil fosfato es esencial para la síntesis de ciertas glucoproteínas necesarias para la regulación del crecimiento normal y para la secreción mucosa. Tanto el retinol como el ácido retinoico se unen a receptores intracelulares específicos, que se unen a continuación al DNA y afectan a la síntesis de proteínas implicadas en la regulación del crecimiento y diferenciación celulares. De este modo, se puede considerar que tanto el retinol como el ácido retinoico actúan como **hormonas esteroides** que regulan el crecimiento y la diferenciación.

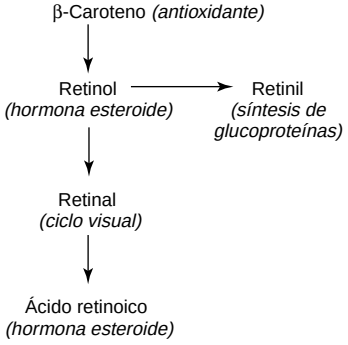


FIGURA 27.2
Metabolismo y función de la vitamina A.

Finalmente, en la forma Δ^{11}-*cis*-retinal, la vitamina A se asocia reversiblemente a las **proteínas visuales** (las opsinas). Cuando la luz incide sobre la retina, se desencadena una serie de procesos bioquímicos complejos que dan como resultado la generación de un impulso nervioso, la conversión del retinal a la forma todo-trans y su disociación de la proteína visual (véase p. 1012). La regeneración de pigmentos visuales funcionales requiere la retroisomerización a la forma Δ^{11}-*cis* (Figura 27.3). Además del papel directo de la vitamina A en el ciclo visual, existen estudios clínicos que sugieren que los carotenoides luteína y zeaxantina reducen el riesgo de degeneración macular.

En base a los datos conocidos acerca de los mecanismos bioquímicos de la acción de la vitamina A, resulta más fácil comprender sus efectos biológicos. La vitamina A es necesaria para mantener un tejido epitelial sano. El retinol y/o el ácido retinoico son necesarios para impedir la síntesis de formas de **queratina** de alta masa molecular y el retinil fosfato es necesario para la síntesis de glucoproteínas (un importante componente del **mucus** que secretan muchos tejidos epiteliales). La falta de secreción mucosa produce sequedad en estas células, y el exceso de síntesis de queratina da lugar a la aparición de una superficie callosa queratinizada en lugar del epitelio húmedo y flexible normal. La deficiencia de vitamina A puede dar lugar a anemia provocada por la movilización defectuosa de hierro desde el hígado, dado que el retinol y/o el ácido retinoico son necesarios para la síntesis de la proteína transportadora de hierro, la transferrina.

Se ha comprobado que los animales con deficiencia de vitamina A son más susceptibles a las infecciones y al cáncer. La menor resistencia frente a las infecciones podría ser debida a la queratinización de las células de la mucosa que tapizan los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. En estas condiciones se forman con facilidad fisuras en las membranas mucosas que permiten la entrada de microorganismos. La carencia de vitamina A puede afectar también al sistema inmunitario. El efecto protector de la vitamina A frente a muchas formas de cáncer es probablemente el resultado del potencial antioxidante de los carotenoides y de los efectos del retinol y del ácido retinoico en la regulación del crecimiento celular.

Dado que la vitamina A se almacena en el hígado, la carencia de esta vitamina sólo puede aparecer después de períodos prolongados de ingestión inadecuada. Las **carencias leves de vitamina A** se caracterizan por **hiperqueratosis folicular** (piel queratinizada rugosa similar a la "piel de gallina"), **anemia** (equivalente bioquímicamente a la anemia ferropénica, pero en presencia de ingestión adecuada de hierro) y aumento de susceptibilidad a la infección y al cáncer. La **ceguera nocturna** es un síntoma precoz de la carencia de vitamina A. La deficiencia grave de vitamina A da lugar a una progresiva queratinización de la córnea ocular, conocida como **xeroftalmia** en sus estados más avanzados. Normalmente aparece infección, que da lugar a hemorragias oculares y a la pérdida permanente de la visión.

Para mucha gente (a menos que coman hígado) las verduras de color verde oscuro y amarillas constituyen la fuente dietética más importante de vitamina A. Desgraciadamente, estos alimentos a menudo están ausentes en la dieta estadounidense. En Estados Unidos las encuestas dietéticas indican que entre el 40% y el 60% de la población consume menos de los dos tercios de la RDA para la vitamina A. En la población general son poco frecuentes los síntomas clínicos de carencia de vitamina A, pero en cambio la carencia de vitamina A es una consecuencia bastante frecuente de las lesiones hepáticas graves o de enfermedades que producen malabsorción de grasas (véase Apli. Clín. 27.1).

La vitamina A se acumula en el hígado. La ingestión de grandes cantidades de esta vitamina durante períodos largos puede ser tóxica. Dosis de 25 000 a 50 000 ER diarios durante meses o años pueden ser tóxicos para muchos niños y adultos. Los síntomas habituales de este exceso comprenden dolor óseo, dermatitis escamosa, aumento del tamaño del hígado y del bazo, náuseas y diarrea. Es prácticamente imposible ingerir cantidades tóxicas de vitamina A a partir de alimentos normales a menos que se coma de manera regular hígado de oso polar (6000 ER/g). La mayor parte de casos de **toxicidad por vitamina A** se deben a la suplementación con dosis masivas de ésta. Por fortuna, esta práctica es relativamente rara en la actualidad, por el conocimiento que se tiene acerca de la toxicidad de la vitamina A.

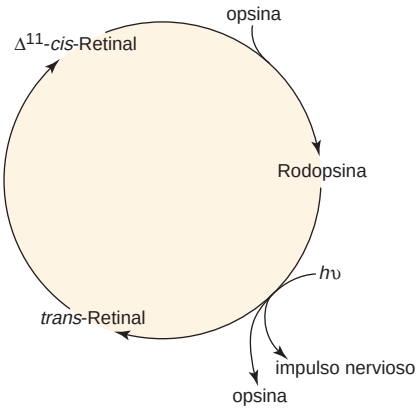
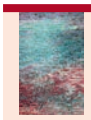


FIGURA 27.3
Papel de la vitamina A en la visión.

La síntesis de vitamina D en el organismo requiere luz solar

Técnicamente, la **vitamina D** debería considerarse una hormona y no una vitamina. El **colecalciferol (D_3)** se produce en la piel mediante irradiación ultravio-



APLICACIÓN CLÍNICA 27.1
Consideraciones nutricionales en la fibrosis quística

Los pacientes con enfermedades de malabsorción a menudo desarrollan malnutrición. La fibrosis quística (FQ) implica una disfunción generalizada de las glándulas exocrinas que conduce a la formación de un mucus viscoso que tapona de manera progresiva los conductos. La obstrucción de los bronquios y de los bronquiolos conduce a infecciones pulmonares que son, habitualmente, la causa inmediata de la muerte. No obstante, en muchos casos también quedan afectadas las glándulas exocrinas del páncreas, lo que lleva a un déficit de enzimas pancreáticos y, a veces, a la obstrucción parcial del conducto biliar común.

El déficit de lipasa pancreática y de sales biliares conduce a malabsorción grave de las grasas y de las vitaminas liposolubles. El calcio tiende a formar sales insolubles con los ácidos grasos de cadena larga, los cuales se acumulan en el intestino. Mientras que éstos son los problemas más graves, también ocurre que algunas féculas y proteínas quedan atrapadas en el bolo graso de los alimentos digeridos parcialmente. Este atrapamiento físico, junto con las deficiencias de amilasa pancreática y de proteasas pancreáticas, puede conducir también a una desnutrición calórica y proteínica graves. El exceso de secreción de mucus en las superficies luminales del intestino puede también interferir con la absorción de diversos nutrientes, incluido el hierro.

Afortunadamente, las preparaciones de microesferas de enzimas pancreáticos disponibles en la actualidad pueden aliviar muchos de estos problemas de malabsorción. Con preparaciones de este tipo, la absorción de proteínas y glúcidos puede acercarse al valor normal. La absorción de grasas mejora mucho, pero no llega a normalizarse, dado que persisten las deficiencias en las sales biliares y el exceso de secreción de mucus. Ya que la grasa de la dieta constituye una de las principales fuentes de calorías, estos pacientes tienen dificultades para obtener las calorías suficientes a partir de una dieta normal. Esto se complica por el incremento en las necesidades proteicas y energéticas que se da en las infecciones crónicas que se suelen observar en estos pacientes. Así, muchos expertos recomiendan ingestiones energéticas que se sitúen entre el 120% y el 150% de las RDA para combatir el crecimiento deficiente y el aumento de la susceptibilidad a infecciones. Las recomendaciones actuales contemplan dietas ricas en energía y proteínas, sin ninguna restricción sobre las grasas de la dieta (50% glúcidos, 15% proteínas y 35% grasas). Si la ingesta calórica de la dieta normal es insuficiente, se pueden utilizar suplementos dietéticos o alimentación enteral. Los suplementos dietéticos suelen contener glúcidos de fácil digestión y mezclas de proteínas lácteas. A veces se utilizan triacilgliceroles de cadena media como sustitutivos parciales de las grasas, ya que pueden ser directamente absorbidos a través de la mucosa intestinal en ausencia de sales biliares y de lipasa pancreática.

Dado que existe una cierta malabsorción de grasas, se observa con frecuencia carencia de vitaminas liposolubles. Los niños entre 2–8 años necesitan preparaciones estándar multivitamínicas para adultos que contengan 400 UI de vitamina D y 5000 UI de vitamina A al día. Niños de edades superiores, adolescentes y adultos necesitan suplementos multivitamínicos estándar a las dosis de 1–2 al día. Si los niveles séricos de vitamina A disminuyen, se deben utilizar preparaciones de vitamina A solubles en agua. Para la vitamina E las recomendaciones son: de 0 a 6 meses, 25 UI día^{-1}; de 6 a 12 meses, 50 UI día^{-1}; de 1 a 4 años, 100 UI día^{-1}; de 4 a 10 años, 100–200 UI día^{-1}; y >10 años, 200–400 UI día^{-1}, en forma soluble en agua. No se ha estudiado de forma adecuada la carencia de vitamina K, pero las recomendaciones actuales son: de 0–12 meses, 2,5 mg semana^{-1} o 2,5 mg dos veces a la semana, si se están tomando antibióticos; >1 año, 5,0 mg dos veces a la semana cuando se está bajo tratamiento con antibióticos o si se presentan enfermedades colestáticas hepáticas. La carencia de hierro es bastante común, pero no suele recomendarse su suplementación, ya que se piensa que los niveles elevados de hierro sanguíneo pueden favorecer infecciones bacterianas sistémicas. Los niveles de calcio sanguíneo suelen ser normales. Sin embargo, dado que la absorción de calcio se halla probablemente por debajo de la óptima, es importante comprobar que la dieta aporta como mínimo los niveles de calcio de las RDA.

Littlewood, J. M. y MacDonald, A. Rationale of modern dietary recommendations in cystic fibrosis. *J. R. Soc. Med.* 80 (Suppl. 15):16, 1987; y Ramsey, B. W., Farrell, P. M. y Pencharz, P. Nutritional assessment and management in cystic fibrosis; a consensus report. *Am J. Clin. Nutr.* 55:108, 1992.

leta del 7-deshidrocolesterol (Figura 27.4). Por tanto, mientras el cuerpo esté expuesto a luz solar adecuada, no hay necesidad, o muy poca, de ingestión dietética de vitamina D. Las mejores fuentes dietéticas de vitamina D_3 son el pescado de agua salada (especialmente, salmón, sardinas y arenques), hígado y yema de huevo. La leche, la mantequilla y otros alimentos se enriquecen habitualmente con **ergocalciferol (D_2)**, que se prepara irradiando ergosterol de levadura. La potencia de la vitamina D se mide en términos de miligramos de colecalciferol (1 mg de colecalciferol o de ergocalciferol = 40 UI).

El colecalciferol y el ergocalciferol se metabolizan de manera idéntica. Ambos son transportados al hígado, donde se forma el derivado 25-hidroxi. El **25-hidroxicolecalciferol** [25-(OH)D] es el principal derivado circulante de la vitamina D, siendo convertido a su vez en los túbulos proximales del riñón en el derivado **1-α,25-dihidroxicolecalciferol** (también denominado **calcitriol**), que es biológicamente activo (véase Apli. Clín. 27.2).

El 1,25-$(OH)_2$D actúa en forma coordinada con la **hormona paratiroidea (PTH)**, la cual también se produce en respuesta a un nivel bajo de calcio sérico. La hormona paratiroidea desempeña un papel primordial en la regulación de la activación de la vitamina D. Niveles elevados de PTH estimulan la producción de 1,25-$(OH)_2$D, mientras que unos niveles de PTH bajos inducen la formación de un 24,25-$(OH)_2$D inactivo. Una vez formado, el 1,25-$(OH)_2$D actúa igual que una hormona esteroide típica en las células de la mucosa intestinal, donde induce la síntesis de una proteína, el calbindeno, necesaria para el transporte de calcio. En el hueso, el 1,25-$(OH)_2$D

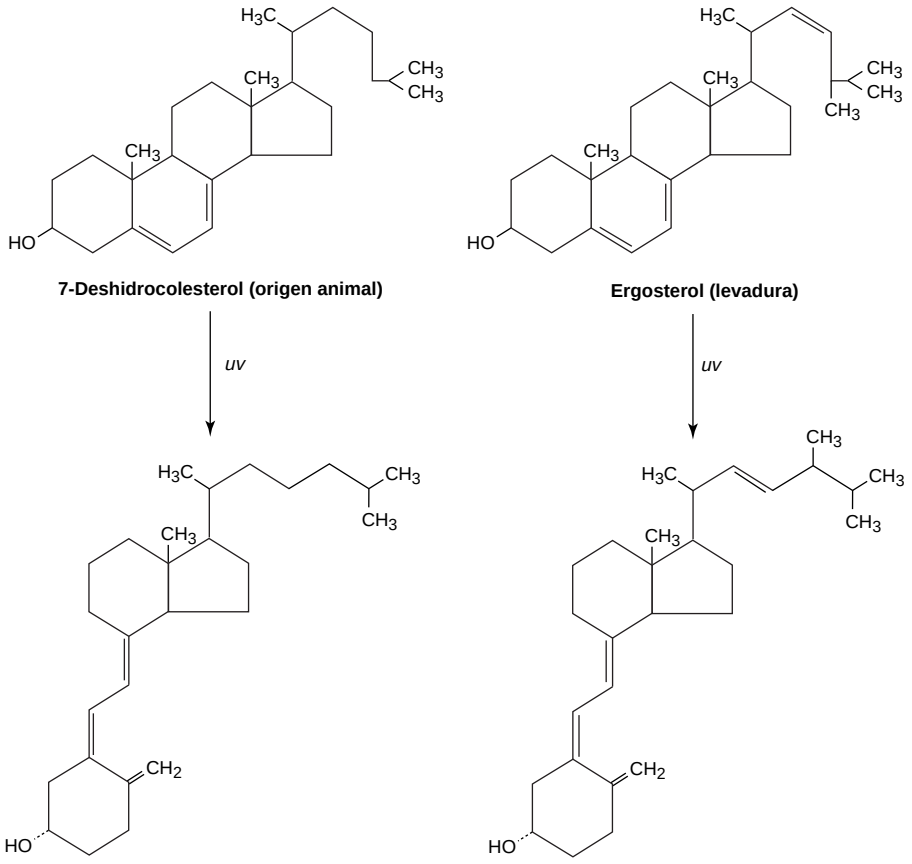
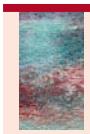


FIGURA 27.4
Estructuras de la vitamina D y compuestos relacionados.

y la PTH actúan de forma sinérgica promoviendo la resorción (desmineralización) del hueso mediante estimulación de la formación y actividad de los osteoblastos. Finalmente, la PTH y el 1,25-$(OH)_2$D inhiben la excreción de calcio en el riñón estimulando la reabsorción del calcio en los túbulos distales del riñón. La calcitonina se produce cuando los niveles de calcio sérico son altos (normalmente justo después de una



APLICACIÓN CLÍNICA 27.2
Osteodistrofia renal

En pacientes afectados de insuficiencia renal crónica tiene lugar una complicada serie de procesos que dan lugar a un estado conocido como osteodistrofia renal. La insuficiencia renal da lugar a una incapacidad para producir 1,25-$(OH)_2$D, con lo que el calcio óseo se convierte en la única fuente importante de calcio sérico. En las últimas etapas de la insuficiencia renal, la situación se complica aun más por el aumento de la retención renal de fosfato, con la consiguiente hiperfosfatemia. Los niveles séricos de fosfato son a menudo lo suficientemente elevados para provocar calcificaciones metastáticas (es decir, calcificación de tejidos blandos), lo que tiende a reducir aun más los niveles séricos de calcio (el producto de solubilidad del fosfato cálcico en el suero es muy bajo, por lo que una elevada concentración sérica de uno de los componentes provoca necesariamente un descenso en la concentración del otro). La hiperfosfatemia y la hipocalcemia estimulan la secreción de hormonas paratiroideas, y el hiperparatiroidismo resultante acelera aun más la velocidad de pérdida de hueso. Ello desemboca en pérdida de hueso y calcificación metastática. En este caso no sería suficiente la administración de elevadas dosis de vitamina D o de sus metabolitos activos, puesto que la combinación de hiperfosfatemia e hipercalcemia sólo daría lugar a una calcificación metastática más extensa. El reajuste de los niveles de calcio sérico mediante dietas de elevado contenido en calcio y/o mediante administración suplementaria de vitamina D debe ir acompañado de terapias de reducción del fosfato. La técnica más común consiste en utilizar antiácidos fijadores de fosfato, que lo convierten en no absorbible. La administración oral de 1,25-$(OH)_2$D es efectiva para estimular la absorción del calcio en la mucosa, pero no penetra en la circulación periférica en cantidades significativas. Así, los pacientes con hiperparatiroidismo grave pueden necesitar tratamiento con 1,25$(OH)_2$D por vía intravenosa. Se está realizando una investigación prometedora con agentes que mimetizan el calcio, los cuales se unen a un sensor de calcio que se encuentra en la membrana extracelular de la glándula paratiroidea y disminuyen la producción y secreción de hormona paratiroidea.

Delmez, J. M. y Siatopolsky, E. Hyperphosphatemia: its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. *Am J. Kidney Dis.* 19:303,1992; Ritz, E., Schomig, M. y Bommer, J. Osteodystrophy in the millennium. *Kidney Int.* 56 (Suppl.73): 594, 1999; y Hoyland, J. A. y Picton, M. L. Cellular mechanisms of osteodystrophy. *Kidney Int*. 56 (Suppl. 73): 508, 1999.

comida) y disminuye los niveles de calcio sérico mediante el bloqueo de la resorción ósea y la estimulación de la excreción de calcio por el riñón. En la Figura 27.5 se resume la respuesta global del metabolismo del calcio a las distintas situaciones fisiológicas. La respuesta a los niveles bajos de calcio sérico se caracteriza por el aumento de la PTH y del 1,25-$(OH)_2$D, que actúan potenciando la absorción de calcio y la resorción ósea, al tiempo que inhiben la excreción de calcio (Figura 27.5*a*). Niveles elevados de calcio sérico bloquean la producción de PTH. Los bajos niveles de PTH permiten que se metabolice el 25-(OH)D a 24,25-$(OH)_2$D y no a 1,25-$(OH)_2$D. En ausencia de PTH y de 1,25-$(OH)_2$D se inhibe la resorción del hueso y se potencia la excreción del calcio. Los niveles de calcio sérico elevados también estimulan la producción de calcitonina, lo que contribuye a la inhibición de la resorción ósea y al aumento de la excreción de calcio. Finalmente, los niveles elevados tanto de calcio como de fosfato séricos aumentan la velocidad de mineralización del hueso (Figura 27.5*b*). Así, el hueso actúa como un depósito muy importante del calcio y fosfato necesarios para mantener la homeostasis de los niveles séricos. Cuando la vitamina D y el calcio de la dieta son adecuados, no se produce pérdida neta de calcio óseo. Sin embargo, cuando el calcio de la dieta es bajo, la PTH y el 1,25-$(OH)_2$D dan lugar a la desmineralización neta del hueso para mantener los niveles normales de calcio sérico. La deficiencia de vitamina D también produce la desmineralización neta de los huesos, debido al aumento de PTH (Figura 27.5*c*).

Los síntomas más comunes de la **carencia de vitamina D** son el **raquitismo** en los niños y la **osteomalacia** en los adultos. El raquitismo se caracteriza por la formación continua de matriz osteoide y de cartílago, que se mineralizan de forma inadecuada, lo que genera huesos blandos y flexibles. En los adultos tiene lugar la desmineralización de los huesos preexistentes, lo que hace que los huesos sean más blandos y más susceptibles a la fractura. La osteomalacia se puede distinguir fácilmente de la más frecuente osteoporosis por el hecho de que la matriz osteoide permanece intacta en la primera, pero no en la segunda. La vitamina D puede intervenir en algo más que en la regulación de la homeostasis del calcio. Se han encontrado receptores para la 1,25-$(OH)_2$D en muchos tejidos, entre los que se encuentran la glándula paratiroidea, los islotes pancreáticos, los queratinocitos de la piel y las células mieloides primordiales de la médula ósea.

Debido al refuerzo de los productos lácteos con vitamina D, las carencias dietéticas son muy poco frecuentes y se observan con mayor frecuencia en grupos de población con ingresos económicos bajos, en las personas de edad (que a menudo toman muy poco el sol), los vegetarianos estrictos (especialmente si su dieta es también baja en calcio y elevada en fibra) y los alcohólicos crónicos. Gran parte de los casos de carencia de vitamina D son resultado de enfermedades que producen **malabsorción de grasas** o enfermedades graves del hígado y del riñón (véanse Aplis. Clíns. 27.1 y 27.2). Algunos fármacos también interfieren con el metabolismo de la vitamina D. Por ejemplo, los corticoesteroides estimulan la conversión de vitamina D en metabolitos inactivos y dan lugar a desmineralización ósea cuando se utilizan durante largos períodos de tiempo.

La vitamina D también puede ser tóxica en dosis elevadas. El Nivel de Ingestión Superior Tolerable (UL) para adultos es 2000 UI/día. En la Figura 27.5*d* se resume el mecanismo de **toxicidad de la vitamina D**. La absorción favorecida de calcio junto con la resorción del hueso dan lugar a hipercalcemia, lo que puede conducir a calcificaciones metastáticas. La resorción ósea facilitada también da lugar a una desmineralización ósea parecida a la observada en la carencia de vitamina D. Finalmente, los niveles elevados de calcio sérico conducen directamente a hipercalciuria, que predispone al paciente para la formación de cálculos renales.

La vitamina E es una mezcla de tocoferoles

Durante muchos años se describió a la **vitamina E** como "vitamina en búsqueda de una enfermedad". A pesar de que las enfermedades por carencia de vitamina E son aún prácticamente desconocidas, en años recientes se ha conocido mejor su papel metabólico en el organismo. La vitamina E se presenta en la dieta como una mezcla de varios compuestos estrechamente relacionados, llamados tocoferoles. El ***α*-tocoferol** es la forma más potente de la vitamina E.

En primer lugar y de forma destacada, los tocoferoles son importantes **antioxidantes** de origen natural. Debido a su carácter lipofílico se acumulan en las lipoproteínas circulantes, membranas celulares y depósitos de grasas, donde reaccionan muy fácilmente con el oxígeno molecular y los radicales libres. Actúan como eliminadores

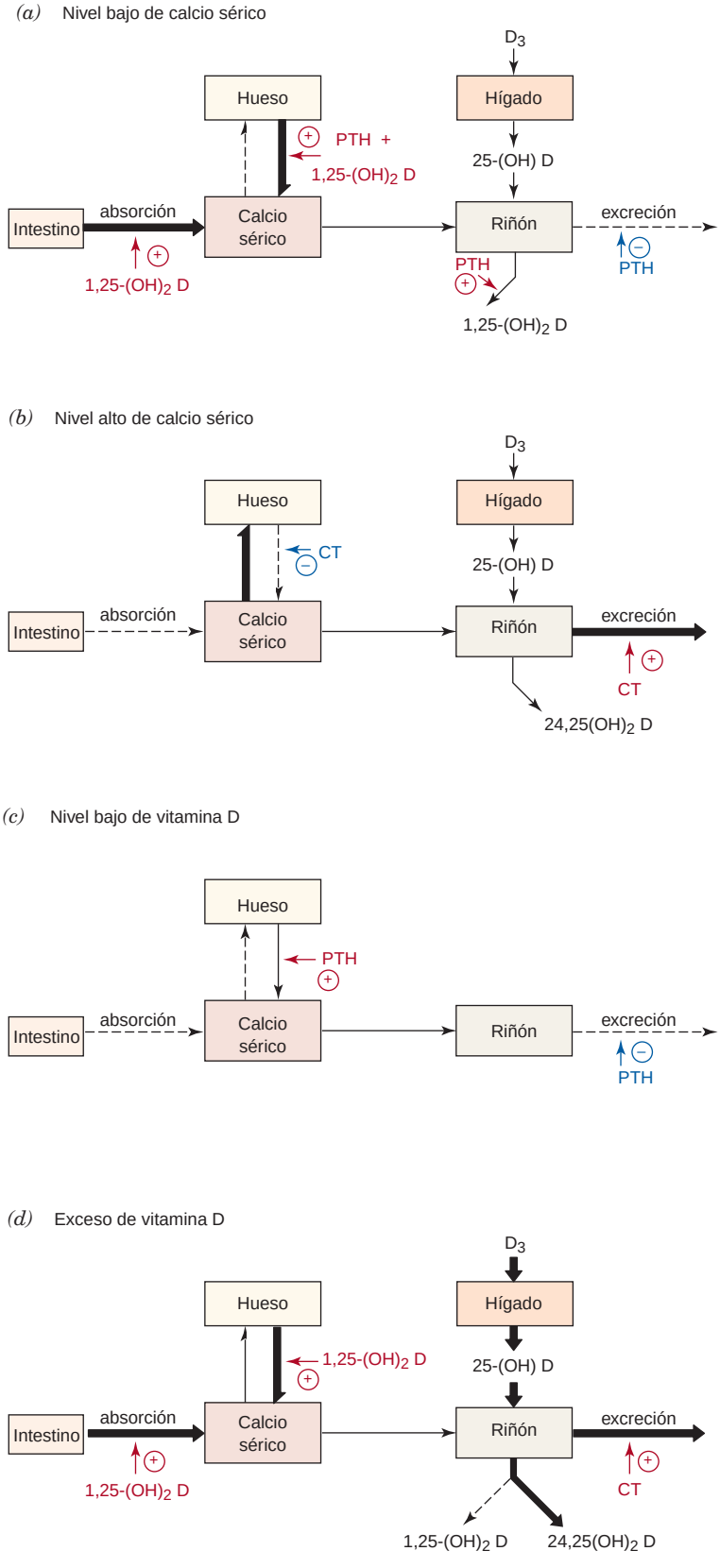


FIGURA 27.5
Vitamina D y homeostasis del calcio.
Las rutas dominantes del metabolismo del calcio en cada conjunto de condiciones metabólicas se muestran con flechas gruesas. El efecto de distintas hormonas se muestra con flechas rojas para la estimulación y flechas azules para la represión. PTH, hormona paratiroidea; CT, calcitonina; D, colecalciferol; 25-(OH)D, 25, hidroxicolecalciferol; y 1,25 $(OH)_2D$, 1-α,25-dihidroxicolecalciferol.

de estos compuestos protegiendo los ácidos grasos insaturados (especialmente los que se encuentran en las membranas) de reacciones de peroxidación. El α-tocoferol parece jugar un papel en la respiración celular, estabilizando la ubiquinona o colaborando en el transporte de electrones hacia ésta (véase p. 567). También parece facilitar la **síntesis de hemo** al incrementar los niveles de ácido δ-aminolevulínico (ALA) sintasa y ALA deshidratasa. La mayoría de los efectos del α-tocoferol podrían ser el resultado indirecto de su potencial antioxidante más que de su participación directa como coenzima en las reacciones bioquímicas. Por ejemplo, un papel importante del α-tocoferol en humanos es impedir la **oxidación de LDL**, dado que parece que la forma aterogénica de las LDL es la oxidada. Finalmente, se han descrito determinados síntomas de tipo neurológico que aparecen tras una deficiencia prolongada de vitamina E asociada con enfermedades de malabsorción. Por otro lado, el γ-tocoferol parece que inactiva mutágenos electrofílicos liposolubles, complementando así el glutatión, que inactiva mutágenos electrofílicos de los compartimientos acuosos de la célula.

Los estudios sobre los valores recomendados de vitamina E en la dieta se han visto obstaculizados por la dificultad de producir deficiencias graves de vitamina E en el ser humano. En general se supone que los niveles de vitamina E en la dieta estadounidense son suficientes, ya que no se han encontrado importantes enfermedades carenciales de vitamina E. No obstante, las exigencias de vitamina E aumentan a medida que aumenta la ingestión de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). A pesar de las recientes afirmaciones de que las dietas con alto contenido en PUFA reducen el colesterol sérico, lo que puede ser beneficioso en el control de las enfermedades cardíacas, la tendencia de los PUFA a formar radicales libres al exponerse a la acción del oxígeno puede conducir a un incremento del riesgo de cáncer. Por ello es prudente aumentar la ingestión de vitamina E en dietas ricas en PUFA.

Los niños prematuros alimentados con fórmulas artificiales con bajo contenido de vitamina E pueden desarrollar una forma de anemia hemolítica que se puede corregir con una suplementación de vitamina E. Los adultos que padecen malabsorción de grasas muestran una disminución en el tiempo de supervivencia de los eritrocitos. De ahí que el suplemento con vitamina E pueda ser necesario en los niños prematuros y en los casos de malabsorción de grasas. En estudios recientes se ha sugerido que se puede disminuir el riesgo de enfermedad cardíaca suplementando con un mínimo de 100 mg de vitamina E día^{-1}. No obstante, estos estudios no son definitivos, de modo que el Food and Nutrition Board ha recomendado un aumento de la RDA de la vitamina E a 15 mg día^{-1}, que corresponde aproximadamente a 22 Unidades Internacionales (UI) de α-tocoferol por día. Esto es más que la cantidad de vitamina E presente en la típica dieta estadounidense, pero mucho menos que los niveles usados en los estudios de intervención clínica para evaluar el efecto de la vitamina E sobre el riesgo de enfermedad cardíaca.

Curiosamente, la vitamina E parece ser un caso en que la forma natural de la vitamina es claramente más efectiva que la forma sintética. Como la proteína que transfiere el α-tocoferol en el hígado se une específicamente al *RRR*-α-tocoferol natural, la forma *RRR* del α-tocoferol se retiene en el cuerpo de cuatro a seis veces más que las forma sintética del α-tocoferol *todo rac* o *d,l*. La vitamina E parece ser la menos tóxica de la vitaminas liposolubles. El UL de la vitamina E se ha establecido en 1000 mg día^{-1} (1500 UI de *RRR*-α-tocoferol) principalmente porque niveles altos de la vitamina podrían potenciar el efecto de las medicaciones diluyentes de la sangre, como el dicumarol.

La vitamina K es un derivado de quinona

La **vitamina K** se encuentra de forma natural como K_1 **(fitilmenaquinona)** en las verduras y como K_2 **(multiprenilmenaquinona)**, que sintetizan las bacterias intestinales. El cuerpo convierte la menaquinona sintetizada químicamente **(menadiona)** y una serie de análogos hidrosolubles a una forma biológicamente activa de la vitamina K. Las necesidades dietéticas se miden en microgramos de vitamina K_1 siendo la RDA de los adultos del orden de 60–80 μg día^{-1}.

La vitamina K_1 es necesaria para la conversión de diversos **factores de coagulación** y de **precursores de la protrombina** al estado activo. El mecanismo de esta acción se ha deducido de forma clara en el caso de la protrombina (véase p. 1047). La protrombina se sintetiza en forma de precursor inactivo, llamado preprotrombina. La conversión a la forma activa requiere una **carboxilación** dependiente de vitamina K de residuos de ácido glutámico específicos para dar ácido **γ-carboxiglutámico** (Figura 27.6). Los residuos de ácido γ-carboxiglutámico son buenos agentes quelantes

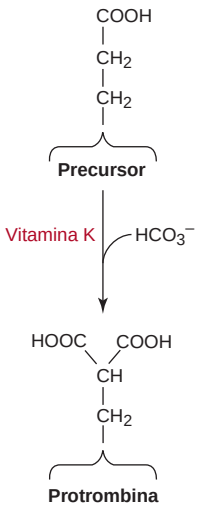
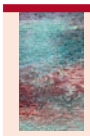


FIGURA 27.6
Función de la vitamina K.

que permiten que la protrombina fije calcio. A su vez, el complejo protrombina–Ca^{2+} se fija a la membrana fosfolipídica, donde puede tener lugar *in vivo* la conversión proteolítica a trombina. No se conoce totalmente el mecanismo de la reacción de carboxilación, pero parece necesitar la formación intermedia de un derivado 2,3-epóxido de la vitamina K. El **dicumarol**, un anticoagulante que se encuentra en la naturaleza, inhibe la reductasa, que vuelve a convertir al epóxido en la vitamina activa.

La vitamina K también es esencial para la síntesis de residuos de ácido **γ**-carboxiglutámico en la proteína **osteocalcina**, que representa el 15–20% de proteína no colagenosa del hueso en la mayoría de los vertebrados. Estos residuos son responsables de la mayor parte de las propiedades de fijación de calcio que presenta la osteocalcina. Debido a que la síntesis de osteocalcina la controla la vitamina D y la osteocalcina podría desempeñar un importante papel en la remodelación del hueso, la vitamina K podría ser importante en el proceso de formación ósea.

El único síntoma fácilmente detectable de **carencia de vitamina K** en el ser humano es el aumento en el tiempo de coagulación. Algunos estudios indican que la deficiencia de vitamina K puede ser también un factor de la **osteoporosis**. Dado que las bacterias intestinales sintetizan vitamina K, hace mucho que se ha asumido que las carencias son muy poco frecuentes. No obstante, la vitamina K sintetizada en el intestino puede no ser absorbida de forma eficiente y las carencias marginales de vitamina K pueden ser comunes. La carencia más común se observa en los recién nacidos (véase Apli. Clín. 27.3), especialmente en aquellos cuyas madres han seguido una terapia con anticonvulsivos (véase Apli. Clín. 27.4). La carencia de vitamina K también se observa en pacientes con **ictericia obstructiva** y otras enfermedades que conducen a la **malabsorción** grave de **grasas** (véase Apli. Clín. 27.1), y en pacientes con terapia antibiótica prolongada (que puede destruir los organismos sintetizadores de vitamina K en el intestino). La carencia de vitamina K se observa en ocasiones en personas de edad que tienen propensión a un funcionamiento hepático insuficiente (reduciendo la síntesis de preprotrombina) y malabsorción de grasas. Ciertamente, debe sospecharse la carencia de vitamina K en cualquier paciente que muestre facilidad para presentar escoriaciones y cuyo tiempo de coagulación sea más largo de lo normal.



APLICACIÓN CLÍNICA 27.3
Consideraciones nutricionales para el recién nacido

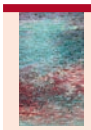
Los niños recién nacidos corren un riesgo nutricional especial, porque existe un crecimiento muy rápido y las necesidades respecto a muchos nutrientes son elevadas. Algunos micronutrientes (tales como las vitaminas E y K) no atraviesan bien la membrana de la placenta, por lo que en el niño recién nacido los depósitos tisulares son bajos. El tracto gastrointestinal puede no estar completamente desarrollado, lo que produce problemas de malabsorción (especialmente con respecto a las vitaminas liposolubles). El tracto gastrointestinal también es estéril en el nacimiento, y la flora intestinal que, normalmente proporciona cantidades significativas de ciertas vitaminas (en especial la vitamina K) tarda varios días en alcanzar su estado normal. Si el niño es prematuro, el riesgo nutricional es ligeramente superior, ya que el tracto gastrointestinal está menos desarrollado, y los depósitos tisulares son menores.

La complicación nutricional más grave de los recién nacidos parece ser la enfermedad hemorrágica. Los recién nacidos, especialmente los prematuros, tienen depósitos tisulares de vitamina K bajos, y carecen de la flora intestinal necesaria para sintetizar dicha vitamina. La leche materna es también una fuente relativamente pobre de vitamina K. Aproximadamente 1 de cada 400 nacimientos muestra algún signo de enfermedad hemorrágica, cosa que puede evitarse con la administración de 1 mg de vitamina después del nacimiento.

La mayoría de los recién nacidos tienen reservas de hierro suficientes para 3–4 meses (aunque los prematuros nacen con reservas menores). Dado que el hierro está presente en pequeñas cantidades tanto en la leche de vaca como en la materna, el suplemento de hierro se inicia en una edad relativamente temprana, mediante introducción en la dieta de cereal reforzado con hierro. Los niveles de vitamina D también son algo bajos en la leche materna, por lo que habitualmente se recomienda un suplemento de vitamina D. No obstante, algunos estudios recientes han sugerido que el hierro de la leche materna se encuentra en una forma que es utilizada especialmente bien por el lactante, y que estudios anteriores probablemente subestimaron la cantidad de vitamina D disponible en la leche materna. Otras vitaminas y minerales están presentes en cantidades adecuadas en la leche materna, si la madre esté sometida a una buena dieta. Cuando los lactantes deben mantenerse con ventilación asistida a altas concentraciones de oxígeno, el suplemento de vitamina E puede reducir el riesgo de displasia broncopulmonar y fibroplasia retrolenticular, dos efectos secundarios posibles de la terapia con oxígeno. La anemia de los prematuros puede responder a suplementos de folato y vitamina B_{12}.

En resumen, se suministra vitamina K suplementaria en el nacimiento para prevenir la enfermedad hemorrágica. A los lactantes que reciben leche materna se les suplementa con vitamina D, introduciéndose el hierro en los alimentos sólidos. A los lactantes alimentados con biberón se les da un suplemento de hierro. Si se debe mantener a los lactantes con oxígeno, el suplemento de vitamina E puede ser beneficioso.

Barness, L. A. Pediatrics. En: H. Schneider, C. E. Anderson y D. B. Coursin (Eds.), *Nutritional Support of Medical Practice,* 2nd ed. New York: Harper & Row, 1983, p. 541; Huysman, M. W. y Sauer, P. J. The vitamin K controversy. *Curr. Opin. Pediatr.* 6:129,1994; Worthington-White, D. A., Behnke, M. y Gross, S. Premature infants require additional folate and vitamin B_{12} to reduce the severity of anemia of prematurity. *Am. J. Clin. Nutr.* 60:930, 1994, y Mueller, D. P. R. Vitamin E therapy in retinopathy of prematurity. *Eye* 6:221, 1992.



APLICACIÓN CLÍNICA 27.4

Fármacos anticonvulsivos y necesidades vitamínicas

Los fármacos anticonvulsivos tales como el fenobarbital o la difenilhidantoína (DPH) constituyen un ejemplo excelente del tipo de interacciones fármaco–nutriente que han de preocupar al médico. La enfermedad ósea metabólica parece ser el efecto secundario más significativo de una terapia prolongada con anticonvulsivos. Mientras que los niños y adultos en tratamiento con estos fármacos pocas veces desarrollan raquitismo u osteomalacia grave, hasta el 65% de los que están sometidos a terapia prolongada presentan niveles anormalmente bajos de calcio y fósforo séricos, y niveles anormalmente elevados de fosfatasa alcalina sérica. En estos casos se observa habitualmente cierta pérdida ósea. Aunque se cree que la causa de la hipocalcemia y la pérdida ósea es un efecto de la acción de los fármacos anticonvulsivos sobre el metabolismo de la vitamina D, no todos los estudios muestran disminución de los niveles de 25-(OH)D y de 1,25-$(OH)_2$D en pacientes que utilizan estos fármacos. No obstante, los suplementos de vitamina D dentro de los márgenes de 2000 a 10 000 unidades/día parecen corregir la hipocalcemia y la osteopenia. Los anticonvulsivos también tienden a incrementar las necesidades respecto a la vitamina K, lo que comporta un incremento en la incidencia de enfermedad hemorrágica en los niños nacidos de madres con terapia anticonvulsiva. Los anticonvulsivos parecen aumentar las necesidades de ácido fólico y B_6. En el 75% de los pacientes se observan niveles séricos bajos de folato, y puede aparecer anemia megaloblástica hasta en un 50% de ellos cuando no hay suplementación. Según parámetros bioquímicos, el 30–60% de los niños bajo terapia anticonvulsiva muestran una forma u otra de carencia de B_6. No obstante, raramente se observan síntomas clínicos de carencia de B_6. 1–5 mg de ácido fólico y 10 mg de vitamina B_6 parecen ser suficientes para la mayoría de los pacientes bajo terapia anticonvulsiva. Dado que los folatos pueden acelerar el metabolismo de algunos anticonvulsivos, es importante que no se administre exceso de ácido fólico.

Moslet, U. y Hansen, E. S. A review of vitamin K, epilepsy and pregnancy. *Acta Neurol. Scand.* 85:39, 1992: Rivery, M. D. y Schottelius, D. D. Phenytoin-folic acid: a review. *Drug Intell. Clin. Pharmacy* 18:292,1984; y Tjellesen, L. Metabolism and action of vitamin D in epileptic patients on anticonvulsant treatment and healthy adults. *Dan. Med. Bull.* 41:139,1994.

27.5 | VITAMINAS HIDROSOLUBLES

Las vitaminas hidrosolubles se diferencian de las vitaminas liposolubles en varios aspectos. La mayoría se excretan fácilmente una vez que su concentración sobrepasa el umbral renal. De este modo, la toxicidad es muy poco frecuente. Una dieta no adecuada produce con relativa rapidez carencias en estas vitaminas. Sus depósitos metabólicos son bastante lábiles, por lo que el agotamiento de los mismos a menudo puede tener lugar en cuestión de semanas o meses. Dado que las vitaminas hidrosolubles son coenzimas de muchas reacciones bioquímicas comunes, se puede medir a menudo el estado vitamínico midiendo una o más actividades enzimáticas en hematíes aislados. Estos ensayos son especialmente útiles si se mide tanto la actividad enzimática endógena como la actividad estimulada después de la adición del coenzima activo derivado de la vitamina en cuestión.

La mayoría de las vitaminas hidrosolubles se convierten en coenzimas que se utilizan en rutas para la generación de energía o para la hematopoyesis. Las carencias de vitaminas liberadoras de energía producen una serie de síntomas que se solapan. En muchos casos, las vitaminas participan en tantas reacciones bioquímicas que es imposible señalar exactamente la causa bioquímica de un síntoma determinado. No obstante, debido al papel central de estas vitaminas en el metabolismo energético, las carencias se manifiestan en primer lugar en los tejidos de crecimiento rápido. Entre los síntomas típicos se incluyen **dermatitis**, **glositis** (hinchazón y enrojecimiento de la lengua), **queilitis** en los extremos de los labios, y **diarrea**. En muchos casos también queda afectado el tejido nervioso, debido a su alta demanda energética o a efectos específicos de la vitamina. Entre los síntomas neurológicos comunes se incluyen la **neuropatía periférica** (hormigueo de los nervios en las extremidades), depresión, confusión mental, falta de coordinación motora y **malestar**. En algunos casos también puede darse una desmielinización y degeneración del tejido nervioso. Estos síntomas carenciales son tan comunes y solapantes que pueden considerarse como propiedades generales de las vitaminas liberadoras de energía más que como síntomas específicos de cualquiera de ellas.

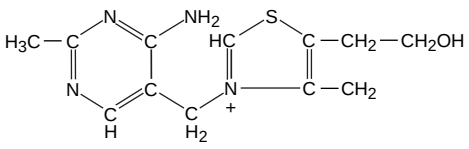


FIGURA 27.7
Estructura de la tiamina.

27.6 | VITAMINAS HIDROSOLUBLES LIBERADORAS DE ENERGÍA

La tiamina (vitamina B_1) forma el coenzima tiamina pirofosfato (TPP)

La **tiamina** (Figura 27.7) se convierte rápidamente en el coenzima **tiamina pirofosfato (TPP)**, que es necesario para reacciones clave catalizadas por los complejos pi-

ruvato y α-cetoglutarato deshidrogenasas (véase Figura 27.8). La capacidad celular para generar energía se ve seriamente comprometida por la carencia de tiamina. El TPP también es necesario para las reacciones de la transcetolasa de la ruta de las pentosas fosfato. La ruta de las pentosas fosfato es la única fuente biosintética de ribosa para la síntesis de precursores de los ácidos nucleicos y es la fuente principal de NADPH para la biosíntesis de ácidos grasos y otras rutas biosintéticas. La transcetolasa eritrocitaria es, además, el enzima más utilizado para medir el nivel de tiamina en el cuerpo. El TPP parece jugar un papel importante en la transmisión de impulsos nerviosos. El TPP (o un metabolito relacionado, la tiamina trifosfato) se localiza en las membranas nerviosas periféricas. Parece ser necesario para la síntesis de acetilcolina, y también puede serlo para reacciones de translocación iónica en el tejido nervioso estimulado.

Aunque las reacciones en las que interviene el TPP están bastante bien caracterizadas, no está clara la forma en que éstas dan lugar a los síntomas de la **carencia de tiamina**. Las reacciones de la piruvato deshidrogenasa y de la transcetolasa son las más sensibles a los niveles de tiamina. La carencia de tiamina parece inhibir de modo selectivo el metabolismo glucídico, dando lugar a una acumulación de piruvato. Las células pueden quedar afectadas directamente por la falta de energía y de NADPH disponibles o pueden quedar envenenadas por el piruvato acumulado. Otros síntomas de la carencia de tiamina afectan al tejido nervioso y podrían ser resultado del papel directo del TPP en la transmisión nerviosa.

Entre los primeros síntomas de la carencia de tiamina se cuentan la pérdida de apetito, estreñimiento y náuseas. La depresión mental, neuropatía periférica, irritabilidad y fatiga son otros síntomas tempranos. Estos síntomas de la carencia de tiamina se observan con mayor frecuencia en las personas de edad y en ciertos grupos de ingresos económicos bajos que ingieren dietas restringidas. Entre los síntomas de la carencia de tiamina moderadamente grave se encuentran la **confusión mental**, **ataxia** (porte inestable al caminar e incapacidad general de conseguir un control fino de las funciones motoras) y **oftalmoplejia** (pérdida de coordinación ocular). Este conjunto de síntomas se conoce habitualmente como **síndrome de Wernicke–Korsakoff**, y se observa con mayor frecuencia entre los **alcohólicos** crónicos (véase Apli. Clín. 27.5). La carencia grave de tiamina se conoce como beriberi. El beriberi seco se caracteriza principalmente por síntomas neuromusculares avanzados, entre los que se cuentan la atrofia y debilidad de los músculos. Cuando estos síntomas van

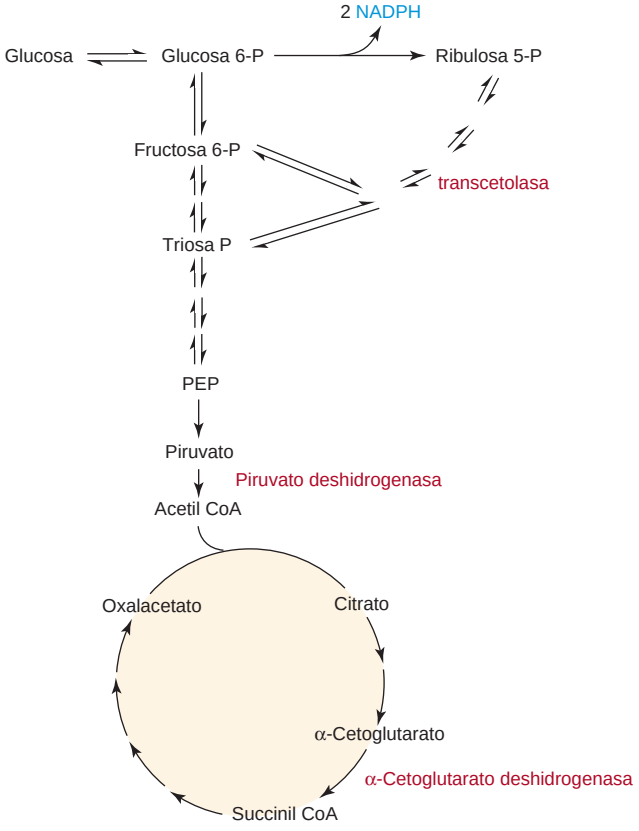
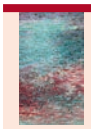


FIGURA 27.8
Resumen de reacciones importantes en las que interviene la tiamina pirofosfato.
Las reacciones en las que interviene la tiamina pirofosfato se indican en rojo.



APLICACIÓN CLÍNICA 27.5
Consideraciones nutricionales para los alcohólicos

Los alcohólicos crónicos corren un riesgo considerable de carencias nutricionales. Los problemas más comunes son síntomas neurológicos asociados con carencias de tiamina o piridoxina, y problemas hematológicos asociados con carencias de folato o de piridoxina. Las carencias observadas en los alcohólicos no se deben necesariamente sólo a la dieta pobre, aunque éste es, con frecuencia, un factor contribuyente importante. El alcohol produce alteraciones patológicas del tracto gastrointestinal que, a menudo, interfieren directamente en la absorción de ciertos nutrientes. La destrucción grave del hígado asociada con el alcoholismo crónico parece interferir directamente en el almacenamiento y activación de nutrientes y vitaminas.

Se calcula que hasta el 40% de los alcohólicos hospitalizados presentan eritropoyesis megaloblástica debida a la carencia de folato. El alcohol interfiere en la absorción del folato, y la cirrosis alcohólica trastorna el almacenamiento de este nutriente. Otro 30% de los alcohólicos hospitalizados presentan anemia sideroblástica o sideroblastos identificables en la células eritroides de la médula y característicos de la carencia de piridoxina. Algunos alcohólicos también desarrollan una neuropatía periférica que responde a la suplementación con piridoxina. Este problema parece surgir por una activación desacoplada y un aumento de degradación de la piridoxina. En concreto, el acetaldehído (un producto final del metabolismo del alcohol) desplaza al piridoxal fosfato de su proteína transportadora en el plasma. El piridoxal fosfato libre es a continuación degradado rápidamente en compuestos inactivos y excretado.

La enfermedad neurológica más espectacular relacionada con la nutrición es el síndrome de Wernicke–Korsakoff. Entre sus síntomas se incluyen trastornos mentales, ataxia (porte inseguro y falta de coordinación motora fina) y movimientos oculares descoordinados. También puede observarse insuficiencia cardíaca congestiva, similar a la que se produce en el beriberi. Aunque este síndrome puede explicar solamente el 1–3% de los trastornos neurológicos relacionados con el alcohol, la respuesta a un suplemento de tiamina es tan espectacular que vale la pena tenerla en cuenta. La carencia de tiamina parece provenir de una absorción defectuosa de tiamina, si bien la cirrosis alcohólica puede también afectar al almacenamiento de tiamina en el hígado.

Pueden producirse carencias de casi todas las vitaminas hidrosolubles, habiéndose descrito ocasionalmente casos de escorbuto y pelagra alcohólicos. El consumo crónico de etanol provoca una interesante redistribución de los depósitos corporales de vitamina A. Los depósitos hepáticos de vitamina A son rápidamente eliminados, mientras que los niveles de vitamina A en el suero y en otros tejidos pueden ser normales o ligeramente elevados. Aparentemente, el etanol origina tanto un incremento en la movilización de vitamina A desde el hígado como un aumento del catabolismo de la vitamina A en el hígado para dar lugar a matabolitos inactivos por el sistema citocromo P450 hepático. Los pacientes alcohólicos tienen una densidad ósea menor y experimentan un aumento en la incidencia de osteoporosis. Esto está relacionado probablemente con la falta del paso de la hidroxilación en el carbono 25 en el hígado, así como con un aumento en la velocidad de metabolismo de la vitamina D a productos inactivos mediante un sistema citocromo P450 activado. Los alcohólicos tienen generalmente niveles de zinc, calcio y magnesio séricos bajos, debido a una ingestión dietética pobre y a un incremento de las pérdidas urinarias. La anemia ferropénica es muy rara, a menos que haya hemorragia gastrointestinal o infección crónica. De hecho, el exceso de hierro es en los alcohólicos un problema más común. Muchas bebidas alcohólicas contienen cantidades relativamente elevadas de hierro, al tiempo que el alcohol parece favorecer la absorción del mismo.

Hayumpa, A. M. Mechanisms of vitamin deficiencies in alcoholism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10:573, 1986; y Lieber, C. S. Alcohol, liver and nutrition. *J. Am. Coll. Nutr.* 10:602,1991.

unidos a edema, la enfermedad se denomina beriberi húmedo. Ambas formas de beriberi pueden estar asociadas con un tipo poco frecuente de insuficiencia cardíaca caracterizada por un impulso cardíaco elevado. El beriberi se encuentra principalmente en poblaciones que se alimentan exclusivamente de arroz descascarillado, aunque la insuficiencia cardíaca también aparece a veces en alcohólicos.

Las necesidades de tiamina son proporcionales al contenido calórico de la dieta, situándose en el intervalo de 1,0–1,2 mg día^{-1} para el adulto normal. Estas cifras deberían aumentarse algo si la ingestión de glúcidos es excesiva o si la velocidad metabólica es elevada (debido a fiebre, trauma, embarazo o lactancia). El café y el té contienen sustancias que destruyen la tiamina, aunque esto no constituye un problema para las personas que consumen cantidades normales de estas bebidas. El enriquecimiento rutinario de los cereales ha asegurado que la mayoría de los estadounidenses tengan una ingestión adecuada de tiamina con una dieta mixta.

La riboflavina forma FAD y FMN

La **riboflavina** es el precursor de los coenzimas flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN), los cuales intervienen en una gran variedad de reacciones redox esenciales para la producción de energía y para la respiración celular. Los síntomas más característicos de la carencia de riboflavina son la queilitis angular, glositis y dermatitis escamosa (especialmente cerca de los pliegues nasolabiales y áreas escrotales). El enzima dependiente de riboflavina más adecuado para determinar el nivel de la riboflavina es la glutatión reductasa eritrocitaria. La ingestión recomendada de riboflavina es de 1,0–1,3 mg día^{-1} para el adulto normal. Entre los alimentos ricos en riboflavina se incluyen la leche, carne, huevos y productos de cereales. Las **carencias de riboflavina** son bastante raras en Estados Unidos.

Cuando tiene lugar una carencia de riboflavina, ocurre normalmente en alcohólicos crónicos. El hipotiroidismo enlentece la conversión de riboflavina en FMN y FAD. No se sabe si ello afecta a los requerimientos de riboflavina.

El ácido nicotínico forma los coenzimas NAD y NADP

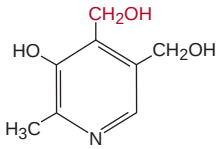
El **ácido nicotínico** no es una vitamina en el sentido más estricto de la palabra, ya que se puede sintetizar una cierta cantidad a partir de triptófano. No obstante, la conversión del triptófano en ácido nicotínico es relativamente poco eficiente (se requieren 60 mg de triptófano para producir 1 mg de ácido nicotínico) y sólo tiene lugar cuando se han satisfecho todas las necesidades corporales de triptófano (síntesis de proteínas y producción de energía). Como la síntesis de ácido nicotínico requiere tiamina, piridoxina y riboflavina, es también un proceso muy ineficiente en una dieta marginal. Así, la mayoría de las personas requieren fuentes dietéticas tanto de triptófano como de ácido nicotínico. El ácido nicotínico y la nicotinamida se convierten en el cuerpo en los coenzimas ubicuos de oxidación–reducción NAD^+ y $NADP^+$.

Las **carencias de ácido nicotínico** muy leves dan lugar a glositis (enrojecimiento) de la lengua, algo similar a la carencia de riboflavina. Las carencias pronunciadas conducen a la **pelagra** caracterizada por las tres D: **dermatitis, diarrea** y **demencia**. La dermatitis es característica en el sentido de que habitualmente sólo se observa en las áreas expuestas a la luz solar y es simétrica. Los síntomas neurológicos están relacionados con una degeneración real del tejido nervioso. Debido a la suplementación de los alimentos, la pelagra es una curiosidad médica en el mundo desarrollado. Actualmente aparece principalmente en **alcohólicos**, pacientes con problemas graves de **malabsorción** y **personas de edad** sometidas a dietas muy restringidas. El embarazo, la lactancia y las enfermedades crónicas conducen a incrementos en las necesidades de ácido nicotínico, si bien una dieta variada proporciona habitualmente cantidades suficientes de ésta.

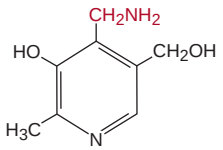
Dado que el triptófano se puede convertir en ácido nicotínico y éste puede estar en forma libre o fijada, el cálculo de su disponibilidad en un alimento determinado no es una cuestión sencilla. Por este motivo, las necesidades de ácido nicotínico se expresan en función de equivalentes de ácido nicotínico (1 equiv de ácido nicotínico = 1 mg de ácido nicotínico libre). La recomendación actual del Food and Nutrition Board para un adulto normal es de 12–16 equivalentes de ácido nicotínico (EN) por día. Los alimentos que constituyen la fuente más rica de ácido nicotínico son las carnes, cacahuetes y otras legumbres, así como los cereales suplementados.

La piridoxina (vitamina B_6) forma el coenzima piridoxal fosfato

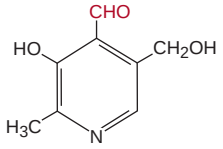
La **piridoxina**, la **piridoxamina** y el **piridoxal** son las formas de la vitamina B_6 (véase Figura 27.9) que aparecen en la naturaleza. Las tres formas se convierten de forma eficiente en el cuerpo dando **piridoxal fosfato**, que se precisa para la síntesis, catabolismo e interconversión de aminoácidos. Previamente (véase p. 783) se ha tratado el papel del piridoxal fosfato en el metabolismo de los aminoácidos. Aunque son muy numerosas las reacciones que dependen del piridoxal fosfato, se dan unos pocos casos en los que la lesión bioquímica parece estar directamente asociada con los síntomas de la carencia de vitamina B_6 (Figura 27.10). El piridoxal fosfato es esencial para la producción de energía a partir de los aminoácidos, por lo que puede ser considerado como una vitamina liberadora de energía. Así, algunos de los síntomas de la carencia grave de B_6 son semejantes a los de otras vitaminas liberadoras de energía. El piridoxal fosfato también se precisa para la síntesis de los neurotransmisores serotonina y noradrenalina, y para la síntesis de los esfingolípidos necesarios para la formación de mielina. Esto podría explicar la irritabilidad, nerviosismo y depresión observados en las carencias leves, y la neuropatía periférica y las convulsiones observadas en las deficiencias graves. El piridoxal fosfato es necesario para la síntesis del ácido δ-aminolevulínico, que es un precursor del hemo. Las **carencias de vitamina B_6** dan lugar en ocasiones a anemia microcítica sideroblástica en presencia de hierro sérico elevado. El piridoxal fosfato está unido covalentemente a un residuo de lisina de la glucógeno fosforilasa y estabiliza el enzima. Esto podría explicar la disminución de la tolerancia a la glucosa asociada con la carencia de esta vitamina, aunque la vitamina B_6 parece también ejercer algunos efectos directos sobre el receptor de glucocorticoides. También se requiere vitamina B_6 para la conversión de homocisteína en cisteína. Esto es importante porque la **hiperhomocisteinemia** parece ser un factor de



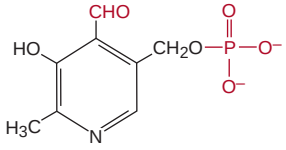
Piridoxina



Piridoxamina



Piridoxal



Piridoxal fosfato

FIGURA 27.9
Estructuras de la vitamina B_6.

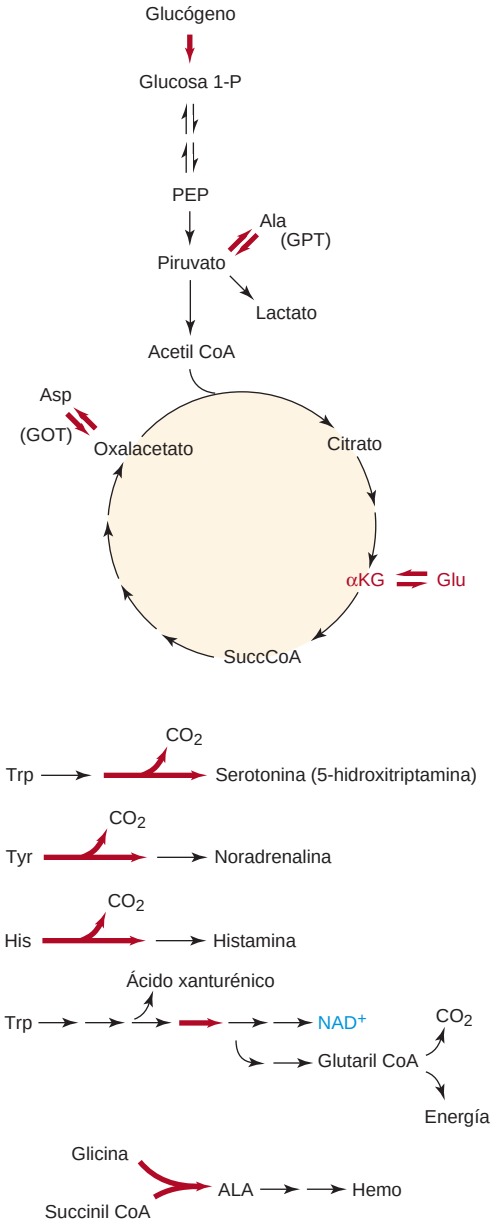
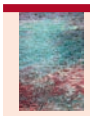


FIGURA 27.10
Algunos papeles metabólicos importantes del piridoxal fosfato.
Las reacciones que requieren piridoxal fosfato se indican con flechas rojas. ALA, ácido δ-aminolevulínico; αKG, α-cetoglutarato; GPT, glutamato piruvato aminotransferasa; y GOT, glutamato oxalacetato aminotransferasa.

riesgo en las enfermedades cardiovasculares. Finalmente, el piridoxal fosfato es uno de los cofactores necesarios para la conversión del triptófano en NAD. Aunque esto puede no estar directamente relacionado con la sintomatología de la carencia de vitamina B_6, uno de los indicadores más sensibles del estado respecto a la vitamina B_6 es la prueba de la carga de triptófano (véase Apli. Clín. 27.6).

La cantidad de vitamina B_6 que se precisa en la dieta es aproximadamente proporcional al contenido proteico de la misma. Suponiendo que el estadounidense medio consume cerca de 100 g de proteína al día, se ha establecido la RDA de vitamina B_6 en 1,3–1,7 mg $día^{-1}$ para adultos normales. Esta exigencia aumenta durante el embarazo y la lactancia, y también puede aumentar algo con la edad. La vitamina B_6 está bastante extendida en los alimentos, aunque entre las fuentes más ricas de ella se encuentran la carne, verduras, cereales completos y yemas de huevo.

La evaluación del estado nutricional respecto a la vitamina B_6 se ha convertido en años recientes en un tema de controversia, como se muestra en la Apli. Clín. 27.6. Generalmente se ha supuesto que los niveles de vitamina B_6 de la dieta estadounidense son adecuados, de modo que no se suele añadir rutinariamente a la harina u otros alimentos reforzados. No obstante, las recientes encuestas sobre nutrición han puesto en duda este supuesto. Se encontró que una fracción significativa de la población encuestada consumía una cantidad inferior a la EAR para la B_6.



APLICACIÓN CLÍNICA 27.6

Necesidades de vitamina B_6 para los consumidores de contraconceptivos orales

La controversia sobre las necesidades de vitamina B_6 en las personas que utilizan contraconceptivos orales ilustra muy bien los problemas potenciales asociados con los ensayos bioquímicos. Durante años, uno de los ensayos más comunes sobre el estatus respecto de la vitamina B_6 ha sido el de la carga de triptófano. Este ensayo se basa en la observación de que, cuando los niveles de piridoxal fosfato tisular son bajos, el catabolismo normal del triptófano está deteriorado, por lo que la mayor parte del triptófano se metaboliza por una ruta minoritaria que lleva a la síntesis de ácido xanturénico. En muchos casos, la cantidad de ácido xanturénico que se recupera en una muestra de orina de 24 horas después de la ingestión de una cantidad determinada de triptófano es un indicador válido del estado de la vitamina B_6. Cuando se utilizó la prueba de la carga de triptófano para evaluar el estado respecto de la vitamina B_6 en las mujeres que utilizan contraconceptivos orales, empezaron a aparecer informes alarmantes en la bibliografía. El uso de los contraconceptivos orales no sólo aumentaba la excreción de ácido xanturénico de manera considerable, sino que la cantidad de piridoxina necesaria para devolver la excreción de ácido xanturénico a sus valores normales era 10 veces la RDA y casi 20 veces el nivel requerido para mantener el estado normal de vitamina B_6 en grupos control. Tal como era de esperar, esta constatación fue objeto de abundante atención popular, a pesar de que no se observaron los síntomas más clásicos de la carencia de vitamina B_6 en las personas que utilizaban contraconceptivos orales.

Estudios más recientes en los que se utilizaron otras mediciones de la vitamina B_6 han delineado un cuadro diferente. Por ejemplo, la glutamato piruvato aminotransferasa y la glutamato oxalacetato aminotransferasa eritrocitarias son dos enzimas que contienen piridoxal fosfato. Se puede también evaluar el estado respecto de la vitamina B_6 midiendo la actividad endógena de estos enzimas y el grado de estimulación al añadir piridoxal fosfato. Estos tipos de ensayos muestran una diferencia mucho menor entre las mujeres que utilizan contraconceptivos orales y las que no los usan. El nivel mínimo de piridoxina necesario para mantener el estado normal de la vitamina B_6, tal como se mide con estos ensayos, fue sólo de 2,0 mg día^{-1}, que es 1,5 veces mayor que la RDA y aproximadamente el doble del que precisaban las mujeres que no utilizaban estos contraconceptivos orales.

¿Por qué esta gran discrepancia? Por un lado, debe tenerse presente que la actividad enzimática puede verse afectada tanto por hormonas como por cofactores vitamínicos. En la vía catabólica del triptófano, la quinureninasa es el enzima clave que contiene piridoxal fosfato, la cual está regulada por la disponibilidad de piridoxal fosfato y por los metabolitos de estrógenos. Incluso en un estado normal de vitamina B_6, la mayor parte del enzima se encuentra en la forma apoenzima inactivo. Esto no afecta, sin embargo, al metabolismo del triptófano, ya que la triptófano oxigenasa, primer enzima de la ruta, limita la velocidad. Por consiguiente, la pequeña cantidad de holoenzima activo es más que suficiente para transformar los metabolitos producidos en la primera parte de la ruta. Sin embargo, la quinureninasa se ve inhibida por los metabolitos de los estrógenos. Así, el uso de contraconceptivos orales reduce la actividad de este enzima hasta un nivel en el que se convierte en limitante, siendo el exceso de metabolitos del triptófano desviados hacia la producción de ácido xanturénico. Unos niveles de vitamina B_6 por encima de los normales evitan el problema, convirtiendo más apoenzima en holoenzima, e incrementando así la cantidad total de enzima. Dado que el estrógeno poseía un efecto específico sobre el enzima utilizado para medir los estados de vitamina B_6, ello no significaba necesariamente que los requerimientos de piridoxina se encontrasen alterados por otros procesos metabólicos corporales.

¿Significa esto que el estado de la vitamina B_6 no debe preocupar a las personas que utilizan contraconceptivos orales? Los contraconceptivos orales parecen aumentar ligeramente las necesidades de vitamina B_6. Diversas encuestas dietéticas han demostrado que un porcentaje significativo de mujeres situadas en el grupo de edad de 18–24 años consumen dietas que contienen menos de 1,3 mg de piridoxina por día. Si estas mujeres utilizan también contraconceptivos orales, sufren un mayor riesgo de desarrollar una carencia que se encuentre en la frontera. Por consiguiente, aunque la prueba de la carga de triptófano fue claramente engañosa desde el punto de vista cuantitativo, alertó a la comunidad médica acerca de un riesgo nutricional insospechado anteriormente.

Bender, D. A. Oestrogens and vitamin B_6: actions and interactions. *World Rev. Nutr. Diet.* 51:140, 1987; y Kirksey, A., Keaton, K., Abernathy, R. P. y Grager, J. L. Vitamin B_6 nutritional status of a group of female adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* 31:946, 1978.

El ácido pantoténico y la biotina forman coenzimas involucrados en el metabolismo energético

El **ácido pantoténico** es un componente del **coenzima A** (CoA) y de la fracción fosfopantoteína de la ácido graso sintasa, por lo que es necesario para el metabolismo de todas las grasas, proteínas y glúcidos vía ciclo del ácido cítrico y para la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Se han descrito hasta el momento más de 70 enzimas que utilizan el CoA o sus derivados. A la vista de la importancia de estas reacciones podría esperarse que las carencias de ácido pantoténico constituyesen una preocupación seria para el ser humano. Éste no es el caso por dos razones: (1) el ácido pantoténico está muy extendido entre los alimentos naturales, lo que refleja probablemente su papel metabólico sumamente extenso y (2) la mayor parte de los síntomas de la carencia de ácido pantoténico son vagos, pareciéndose a los de otras carencias de vitaminas del grupo B.

La **biotina** es el grupo prostético que se une covalentemente a la piruvato carboxilasa (necesaria para la síntesis de oxalacetato para la gluconeogénesis y reposición de intermediarios del ciclo del ácido cítrico), la acetil CoA carboxilasa (biosíntesis de ácidos grasos), y la propionil-CoA carboxilasa (metabolismo de la metionina, leucina y valina). La biotina se encuentra en los cacahuetes, chocolate y huevos, y es sintetizada por las bacterias intestinales. Estudios recientes sugieren que la biotina sintetizada por las bacterias intestinales podría no estar presente en el lugar o en la forma que pueda contribuir significativamente a la biotina absorbida.

27.7 | VITAMINAS HIDROSOLUBLES HEMATOPOYÉTICAS

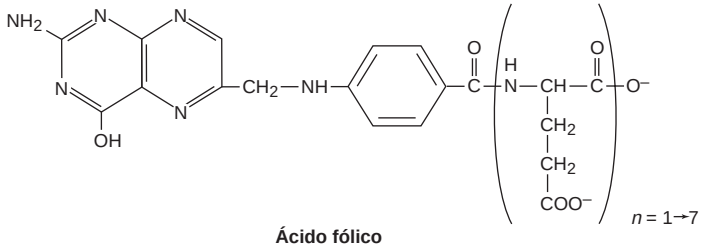
El ácido fólico (folacina) actúa en forma de tetrahidrofolato en el metabolismo monocarbonado

La forma más sencilla del **ácido fólico** es el ácido pteroilmonoglutámico. No obstante, el ácido fólico se presenta habitualmente en forma de derivados **poliglutamato** con un total de 2 a 7 residuos de ácido glutámico (Figura 27.11). Las células de la mucosa intestinal captan estos compuestos, eliminando los residuos de glutamato sobrantes mediante la **conjugasa**, que es un enzima lisosómico. El ácido fólico libre se reduce entonces a **tetrahidrofolato** mediante el enzima **dihidrofolato reductasa** y circula en el plasma mayoritariamente en forma de derivado N^5-metilo del tetrahidrofolato libre (Figura 27.11). En el interior de las células, los tetrahidrofolatos se encuentran principalmente en forma de derivados poliglutamato, los cuales parecen ser las formas biológicamente más potentes. El ácido fólico también se almacena en el hígado en forma de derivado poliglutamato del tetrahidrofolato.

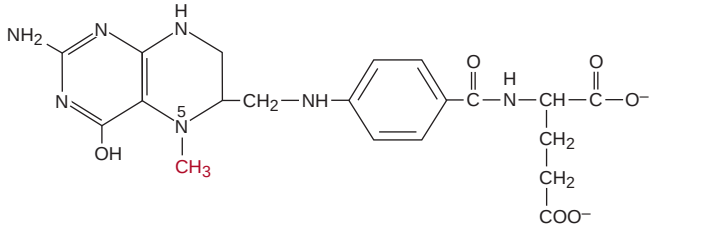
En algunas reacciones biosintéticas se utilizan diversos derivados monocarbonados del tetrahidrofolato (véase Figura 27.12), como en la síntesis de colina, serina, glicina, purinas y dTMP. Además, se requiere tetrahidrofolato, vitamina B_{12} y piridoxal fosfato para la conversión de homocisteína en metionina. La metionina, por supuesto, pasa a *S*-adenosilmetionina, utilizada en muchas reacciones de metilación.

El efecto más pronunciado de la **carencia de folato** es la inhibición de la síntesis de DNA debida a una disminución en la disponibilidad de purinas y de dTMP. Esto lleva a una detención de las células en la fase S y a un cambio "megaloblástico" característico en el tamaño y forma de los núcleos de las células en división rápida. El bloqueo de la síntesis de DNA retarda la maduración de los hematíes, dando lugar a la producción de hematíes "macrocíticos" anormalmente grandes con membranas frágiles. Así, una **anemia macrocítica** asociada a cambios megaloblásticos en la médula ósea es característica de la carencia de folato. Además, la **hiperhomocisteinemia** es bastante común entre la población de más edad, y parece deberse a una ingestión insuficiente y/o a una menor utilización del folato, de la vitamina B_6 y de la vitamina B_{12}. Como se ha dicho anteriormente, la hiperhomocisteinemia parece ser un factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares. Los niveles de homocisteína elevados suelen responder a la suplementación con ácido fólico, vitamina B_6 y vitamina B_{12}.

Entre las causas de la carencia del folato se encuentran la ingesta inadecuada, la necesidad más elevada, la absorción deficiente, el aumento de demanda y el metabolismo deteriorado. Algunas encuestas dietéticas sugieren que la ingesta inadecuada puede ser más frecuente de lo que se suponía anteriormente. Sin embargo, al igual que sucede con muchas vitaminas, la ingestión inadecuada es en muy raras ocasiones causa suficiente para desencadenar síntomas de carencia de folato en ausencia de



Ácido fólico



***N*5-Metiltetrahidrofolato**

FIGURA 27.11
Estructura del ácido fólico y del N^5-metiltetrahidrofolato.

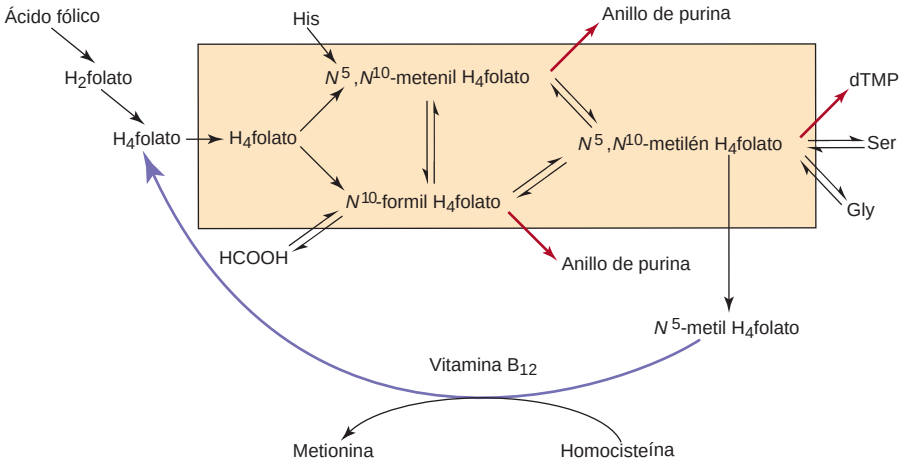
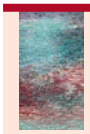


FIGURA 27.12
Papeles metabólicos del ácido fólico y de la vitamina B_{12} en el metabolismo de los compuestos monocarbonados.
Las interconversiones metabólicas del ácido fólico y sus derivados se indican mediante flechas negras. Con flechas rojas se muestran las rutas que dependen únicamente del folato. Se indica con una flecha azul la importante reacción dependiente de B_{12} que convierte el N^5-metil H_4folato a H_4folato. En el recuadro se incluye el conjunto de derivados monocarbonados del H_4folato.

mayores necesidades o menor utilización. Estudios recientes sugieren que los polimorfismos genéticos que aumentan la necesidad de folato podrían ser más comunes de lo que se creía anteriormente (véase Apli. Clín. 27.7). No obstante, el ejemplo más común del incremento en las necesidades tiene lugar durante el **embarazo** y la **lactancia**. A medida que aumenta el volumen sanguíneo y el número de células en rápida división en el cuerpo, aumenta también la necesidad respecto al ácido fólico. Llegado el tercer trimestre casi se han doblado los requerimientos de ácido fólico. En Estados Unidos, el 20–25% de los embarazos, por lo demás normales, están asociados con unos niveles bajos de folato sérico, aunque de hecho la anemia megaloblástica es poco frecuente y sólo se observa después de múltiples embarazos. No obstante, estudios recientes han demostrado que niveles insuficientes de folato durante las primeras etapas del embarazo aumentan el riesgo de **malformación del tubo neural**, un tipo de defecto de nacimiento. Las dietas normales raramente aportan los 600 mg de folato necesarios durante el embarazo. Por ello, en enero del año 1998, la Food and Drug Administration aplicó una nueva legislación que requería que los



APLICACIÓN CLÍNICA 27.7
Polimorfismos genéticos y necesidad de ácido fólico

La suplementación con ácido fólico disminuye el riesgo de malformación del tubo neural y reduce los niveles de homocisteína sérica, lo cual puede disminuir el riesgo de enfermedad cardíaca. Esta información ha llevado a un aumento de la RDA del ácido fólico y a la suplementación de los productos derivados de cereales con ácido fólico. Aun así, está claro que, incluso con una dieta mínima, no todos los adultos presentan niveles elevados de homocisteína y no todas las madres dan a luz bebés con malformación del tubo neural. ¿Qué determina estas respuestas individuales frente una ingestión inadecuada de folato? Los polimorfismos genéticos pueden ser parte de la respuesta. Un polimorfismo común es el que resulta de la sustitución C → T en el gen de la 5,10-metiltentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), que produce el 5-metiltetrahidrofolato necesario para la conversión de homocisteína en metionina. La sustitución C → T en la posición 677 produce la sustitución de una valina por una alanina, lo que hace que el enzima tenga una actividad específica menor y una estabilidad reducida. Respecto a este polimorfismo, aproximadamente el 12% de los caucásicos y asiáticos son homocigóticos (T/T) y el 50% son heterocigóticos (C/T). En individuos con el genotipo T/T que consumen una dieta normal, las concentraciones de folato plasmático son significativamente menores y los niveles de homocisteína plasmática son significativamente más elevados. Además, el genotipo T/T es un factor de riesgo significativo para la malformación del tubo neural, explicando, quizás, hasta el 15% de los casos. Se está llevando a cabo una investigación activa de los polimorfismos genéticos de otros genes que codifican enzimas implicados en el metabolismo del folato. Se han descrito polimorfismos en los genes que codifican la metionina sintasa y el receptor α del folato, el receptor celular necesario para la captación de 5-metiltetrahidrofolato. Ambos parecen ser benignos. No obstante, estudios recientes sugieren que la absorción de folato en el intestino podría ser menor en madres con un historial de embarazos con malformación del tubo neural en comparación con madres control. La genética de este efecto aún no se ha estudiado.

Bailey, L. B. y Gregory, J. F. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks, and impact on folate requirement. *J. Nutr.* 129:919, 1999; Barber, R. C., Lammer, E J., Shaw, G. M., Greer, K. A. y Finnell, R. H. The role of folate transport and metabolism in neural tube defect risk. *Mol. Genet. Metab.* 66:1, 1999; y Bodie, A. M., Dedlow, E. R., Nackoski, J. A., Opalko, F. J., Kauwell, G. P.A., Gregory, J. F. y Bailey, L. B. Folate absorption in women with a history of neural tube defect-affected pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:154, 2000.

productos de cereales enriquecidos fueran suplementados con ácido fólico a una concentración de 1,4 mg por gramo de producto. Este nivel de suplementación se ideó para conseguir un aumento de la ingestión media de ácido fólico de 100 mg día^{-1}. Esta decisión ha resultado ser algo polémica. Se planeó introducir una cantidad extra de 100 mg día^{-1} para disminuir el riesgo de malformación del tubo neural y de hiperhomocisteinemia en un valor de ≥20%. La adición de una cantidad extra de 200 mg día^{-1} a la dieta estadounidense ofrecería una protección mucho mayor contra la malformación del tubo neural y la hiperhomocisteinemia, pero una suplementación con este nivel de ácido fólico podría enmascarar los síntomas de la carencia de vitamina B_{12}, descritos más adelante. Por este motivo, la mayoría de los médicos recomiendan de manera rutinaria la suplementación a las mujeres que se encuentran en edad reproductora y a las personas de edad avanzada. La carencia de folato es común entre los alcohólicos (véase Apli. Clín. 27.5). También se observan carencias de folato en diversas enfermedades de malabsorción, así como en ocasiones en los ancianos, debido a la combinación de hábitos dietéticos deficientes y absorción baja.

Los **anticonvulsivos** y los **contraconceptivos orales** pueden interferir con la absorción del folato; además, parece que los anticonvulsivos aumentan el catabolismo de los folatos (véase Apli. Clín.27.4). Los contraconceptivos orales y los estrógenos interfieren con el metabolismo del folato en su tejido diana. La utilización prolongada de estos fármacos puede llevar a carencia de folato, a menos que se proporcione el suplemento adecuado. Por ejemplo, el 20% de las pacientes que utilizan contraconceptivos orales experimentan cambios megaloblásticos en el epitelio cervicovaginal y 20–30% muestran valores de folato sérico bajos.

La vitamina B_{12} (cobalamina) contiene cobalto dentro de un anillo tetrapirrólico

La **anemia perniciosa**, anemia megaloblástica asociada con deterioro neurológico, era indefectiblemente letal hasta 1926, año en que se demostró que los extractos de hígado daban lugar a su curación. Trabajos posteriores demostraron la necesidad de la presencia de un factor extrínseco en el hígado y la de un **factor intrínseco** producido por el cuerpo. La **vitamina B_{12}** era el factor extrínseco. La vitamina B_{12} consta de **cobalto** en un estado de coordinación seis, coordinado en 4 posiciones con un anillo de tetrapirrol (corrina), con un nitrógeno del bencimidazol en una posición, y con uno de entre diversos ligandos en la sexta posición (Figura 27.13). Las formas cristalinas de la B_{12} utilizadas como suplemento son habitualmente la hidroxicobalamina o la cianocobalamina. En los alimentos, la B_{12} se encuentra normalmente ligada a proteína en la forma metilo o 5′-desoxiadenosilo. Para poder ser utilizada, la B_{12} ha de ser separada en primer lugar de la proteína mediante hidrólisis ácida en el estómago o por digestión tríptica en el intestino. Debe combinarse seguidamente con el factor intrínseco, que es una proteína secretada por el estómago, y que la transporta al íleon para su absorción.

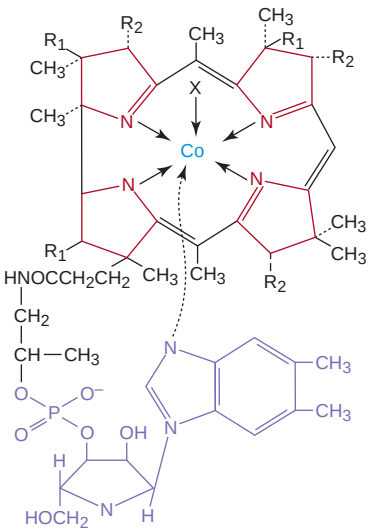


FIGURA 27.13
Estructura de la vitamina B_{12} (cobalamina).

En el ser humano existen dos síntomas principales de **carencia de B_{12}** (hematopoyética y neurológica) y sólo dos reacciones bioquímicas en las que se sabe que participa la B_{12} (Figura 27.14). Es, por consiguiente, muy tentador especular sobre los mecanismos exactos de causa y efecto. El derivado metilo de la B_{12} es necesario para la reacción de síntesis de la metionina, que convierte la homocisteína en metionina, y el derivado 5-desoxiadenosilo se requiere para la reacción de la metilmalonil-CoA mutasa (metilmalonil CoA → succinil CoA), la cual es una reacción clave en el catabolismo de algunos aminoácidos ramificados. Las alteraciones neurológicas observadas en la carencia de B_{12} se deben a la desmielinización progresiva del tejido nervioso. Se ha propuesto que el metilmalonil CoA que se acumula interfiere con la formación de la vaina de mielina de dos maneras. (1) El metilmalonil CoA es un inhibidor competitivo del malonil CoA en la biosíntesis de ácidos grasos. Dado que la vaina de mielina está sujeta a un recambio constante, cualquier inhibición grave de la biosíntesis de ácidos grasos conducirá finalmente a su degeneración. (2) En la síntesis de ácidos grasos, el metilmalonil CoA puede sustituir al malonil CoA, dando así lugar a ácidos grasos ramificados que podrían romper la estructura de la membrana. Existen algunos datos que apoyan la existencia de ambos mecanismos.

Se cree que la anemia megaloblástica asociada a la carencia de B_{12} refleja el efecto de la B_{12} sobre el metabolismo del folato. La reacción de síntesis de metionina dependiente de la B_{12} (homocisteína + N^5-metil THF → metionina + THF) parece ser la única ruta mayoritaria por la que el N^5-metiltetrahidrofolato puede vol-

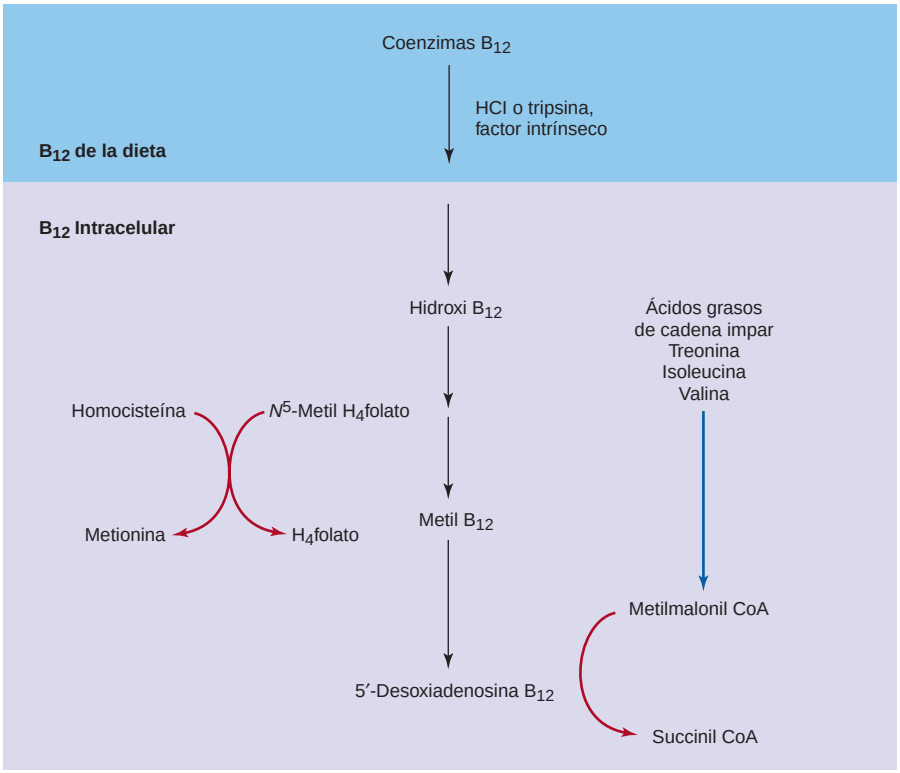


FIGURA 27.14
Metabolismo de la vitamina B_{12}.
Las interconversiones metabólicas de la B_{12} se indican con flechas negras y las reacciones que requieren B_{12} se indican con flechas rojas. Otras rutas relacionadas se indican con una flecha azul.

ver a los depósitos del tetrahidrofolato (Figura 27.14). Así, en la carencia de B_{12} se da una acumulación de N^5-metiltetrahidrofolato y una carencia de los derivados del tetrahidrofolato necesarios para la biosíntesis de purinas y dTMP. De hecho, todo el folato queda "atrapado" en forma de derivado N^5-metilo. La inhibición de la conversión del N^5-metiltetrahidrofolato a tetrahidrofolato también afecta a la capacidad de la célula para convertir el tetrahidrofolato en su forma poliglutaminada, ya que el N^5-metiltetrahidrofolato es un mal sustrato para la reacción de poliglutaminación. Esto también incrementa la necesidad de ácido fólico, porque las células retienen la forma poliglutaminada del tetrahidrofolato. Grandes cantidades de folato procedentes de un suplemento pueden superar la anemia megaloblástica asociada con la carencia de B_{12}, pero no los problemas neurológicos. Éste es el quid de la discusión actual acerca de de los niveles óptimos de suplementación de los alimentos con folato. Es la anemia megaloblástica la que normalmente lleva el paciente a la consulta del médico. De este modo, mediante el enmascaramiento de la anemia, una suplementación de los alimentos rutinaria con elevados niveles de folato podría impedir la detección de una carencia de vitamina de B_{12} hasta que las lesiones neurológicas se hubieran convertido en irreversibles.

La vitamina B_{12} está muy extendida entre los alimentos de origen animal, especialmente carnes y el hígado almacena la cantidad de vitamina B_{12} necesaria para un período de hasta 6 años. De este modo, las carencias de B_{12} son raras. Estas aparecen sobre todo en ancianos debido a la producción insuficiente de factor intrínseco y/o de HCl en el estómago. La carencia de B_{12} también se puede observar en pacientes con enfermedades graves de malabsorción y en vegetarianos durante períodos largos.

27.8 OTRAS VITAMINAS HIDROSOLUBLES

El ácido ascórbico participa en reacciones de reducción e hidroxilación

La **vitamina C** o **ácido ascórbico** es un compuesto con seis átomos de carbono estrechamente relacionado con la glucosa. Su papel biológico principal es el de agente reductor en la hidroxilación de lisina y prolina en el protocolágeno. Sin esta hidroxilación, el protocolágeno es incapaz de formar los enlaces cruzados normales ne-

cesarios para formar las fibrillas de colágeno. Así, la vitamina C es obviamente importante para el mantenimiento del tejido conjuntivo normal y para la curación de heridas, ya que el tejido conjuntivo es el primero en repararse. También se requiere vitamina C para la formación del hueso, ya que el tejido óseo contiene una matriz orgánica con colágeno así como una porción inorgánica calcificada. El colágeno es un componente de la sustancia basal que rodea las paredes de los capilares, con lo que la carencia de vitamina C se asocia con **fragilidad de los capilares**.

Dado que la vitamina C se concentra en la glándula adrenal, podría ser necesaria para las reacciones de hidroxilación que intervienen en la síntesis de algunos corticosteroides especialmente en períodos de estrés. El ácido ascórbico funciona como un agente reductor no enzimático. Por ejemplo, ayuda a la **absorción del hierro** al reducirlo a su estado ferroso en el estómago. Protege la vitamina A, vitamina E y algunas vitaminas B de la oxidación. Además, favorece la utilización del ácido fólico ayudando a la conversión del folato en tetrahidrofolato o mediante la formación de derivados poliglutamato del tetrahidrofolato. Finalmente, parece ser que la vitamina C es un antioxidante biológicamente importante. El National Research Council ha llegado recientemente a la conclusión de que cantidades adecuadas (niveles RDA) de antioxidantes tales como el β-caroteno y la vitamina C en la dieta reducen el riesgo de cáncer.

La mayor parte de síntomas de la **carencia de vitamina C** se pueden relacionar directamente con sus papeles metabólicos. Entre los síntomas de carencia leve de vitamina C se encuentran la facilidad para producirse heridas, y la formación de petequias (pequeñas hemorragias en forma de punto en la piel), debidas al incremento de la fragilidad de los capilares y a una disminución en la inmunocompetencia. El **escorbuto**, una forma carencial más grave, está asociado con una disminución en la capacidad de curar heridas, osteoporosis, hemorragias y anemia. La osteoporosis resulta de la incapacidad de mantener la matriz orgánica colagenosa del hueso, lo que va seguido de desmineralización. La anemia se debe a la extensa hemorragia, asociada con defectos en la absorción del hierro y en el metabolismo del folato.

Dado que la vitamina C se absorbe fácilmente, las carencias se producen casi invariablemente a causa de una dieta pobre o incremento de su necesidad. No está clara la necesidad de vitamina C en períodos de estrés. En las situaciones graves de estrés o trauma se produce una disminución rápida de los niveles séricos de vitamina C. En estas situaciones, la mayor parte del suministro corporal de vitamina C se moviliza hacia la glándula adrenal y/o el área de la herida. ¿Representa esto un incremento en la demanda de vitamina C, o es simplemente una redistribución de la vitamina C hacia aquellas áreas que más la necesitan? ¿Se deterioran las funciones de la vitamina C en otros tejidos corporales al disminuir sus niveles en el suero? El consenso actual parece admitir que la disminución de los niveles séricos de la vitamina C indican un incremento de la demanda, pero existe poco acuerdo sobre el grado de la misma.

Fumar disminuye los niveles séricos de vitamina C. De hecho, las RDA del 2000 recomendaban a los fumadores el consumo de 110–125 mg de vitamina C diarios en lugar de los 75–90 mg que precisan los adultos no fumadores. La **aspirina** parece bloquear la captación de vitamina C por los leucocitos. Los **contraconceptivos orales** y los **corticosteroides** también disminuyen los niveles séricos de vitamina C. Si bien no existe un acuerdo general acerca de la gravedad de estos efectos, debería tenerse en cuenta la posibilidad de carencias marginales de vitamina C en el caso de cualquier paciente en tratamiento con estos fármacos durante un período prolongado, especialmente si la ingestión en la dieta es inferior a la óptima.

La cuestión más controvertida sobre la vitamina C es su utilización en megadosis para prevenir y curar el **resfriado común**. Desde que Linus Pauling popularizó el uso de la vitamina C en 1970, este tema ha generado una controversia considerable. No obstante, algunos estudios de doble ciego sugieren que, mientras que la suplementación con vitamina C no parece ser útil para prevenir el resfriado común, puede moderar sus síntomas o acortar su duración. Se desconoce el mecanismo por el que la vitamina C mejora los síntomas del resfriado común. Se ha sugerido que la vitamina C es necesaria para la función normal de los leucocitos o para la síntesis y liberación de histamina en las situaciones de estrés.

Mientras que las megadosis de vitamina C probablemente no son más perjudiciales que los medicamentos contra los resfriados que se expenden ampliamente, la ingestión elevada de vitamina C produce algunos efectos secundarios potenciales que deben tenerse en cuenta. Por ejemplo, el oxalato es un metabolito principal del ácido ascórbico. De este modo, la ingestión elevada de ascorbato puede llevar, teóricamente,

a la formación de cálculos de oxalato en el riñón en los individuos con predisposición a ello. Sin embargo, la mayoría de los estudios muestran que el exceso de vitamina C se excreta principalmente en forma de ascorbato y no de oxalato. Las mujeres embarazadas que toman megadosis de vitamina C pueden dar a luz niños con necesidades anormalmente elevadas de vitamina C. Se ha demostrado que no era cierto que las megadosis de vitamina C interfiriesen con el metabolismo de la B_{12}, tal como se había sugerido anteriormente. El UL de la vitamina C se ha establecido en 2000 mg día^{-1}, ya que niveles más elevados pueden producir diarrea en algunos individuos.

La colina realiza muchas funciones en el cuerpo

La vitamina **colina** es necesaria para la síntesis y liberación de acetilcolina, un **neurotransmisor** importante implicado en el almacenamiento de memoria, control motor y otras funciones. También es el precursor para la síntesis de los fosfolípidos fosfatidilcolina (lecitina) y esfingomielina, los cuales son importantes para la función de la membrana, la señalización intracelular y la exportación hepática de lipoproteínas de muy baja densidad. La fosfatidilcolina también juega un papel en la eliminación de colesterol de los tejidos debido a la importancia de la reacción de la lecitina–colesterol acetiltransferasa en el transporte inverso de colesterol (véase p. 749). Finalmente, la colina es un precursor para la formación del donador de metilos betaína.

La necesidad de colina en la dieta no está firmemente establecida. Estudios en roedores indican que la **carencia de colina** aumenta el riesgo de cáncer de hígado y déficit de memoria en animales de edad, pero estos efectos no se han demostrado en humanos. La suplementación con lecitina produce un efecto de ligero descenso del colesterol sérico y la suplementación con colina y betaína parece disminuir los niveles de homocisteína sérica en humanos. No obstante, los datos actuales son insuficientes para sacar conclusiones firmes acerca de los posibles efectos de la suplementación con colina y/o lecitina sobre el riesgo cardiovascular. Existe una vía endógena para la biosíntesis *de novo* de colina a través de la metilación secuencial de la fosfatidiletanolamina usando S-adenosilmetionina como donador de metilos. De este modo, la demanda de colina en la dieta se ve modificada por la ingestión de metionina, folato y vitamina B_{12}. En un estudio publicado sobre los efectos de un aporte dietético de colina inadecuado en hombres saludables con una ingestión adecuada de metionina, folato y vitamina B_{12}, se observó que al final de tres semanas los sujetos presentaban una disminución de los depósitos de colina y un aumento de alanina aminotransferasa, lo que indica una posible lesión hepática. Los individuos alimentados con soluciones de nutrición parenteral total sin colina pero con niveles adecuados de metionina y folato, también desarrollaban hígados grasos y niveles elevados de alanina aminotransferasa sérica. En base a estos y otros estudios, el Food and Nutrition Board ha establecido una AI de 425 mg día^{-1} para las mujeres y de 550 mg día^{-1} para los hombres. La colina se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos. Se estima que el estadounidense medio consume 730–1040 mg día^{-1}, de modo que las carencias de colina son improbables.

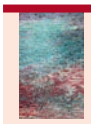
27.9 MACROMINERALES

El calcio desempeña numerosas funciones fisiológicas

El **calcio** es el mineral más abundante del cuerpo. La mayor parte se encuentra en los huesos, pero la pequeña cantidad de Ca^{2+} que se encuentra fuera de ellos participa en una serie de procesos esenciales. El calcio se requiere para la actividad de muchos enzimas, interviene en algunas respuestas hormonales y es esencial para la coagulación de la sangre. También es esencial para la contracción muscular y para la irritabilidad neuromuscular normal. De hecho, el intervalo de niveles de Ca^{2+} sérico compatibles con la vida es relativamente estrecho. Dado que el mantenimiento de niveles de calcio sérico constantes es tan vital, se ha desarrollado un sistema de control homeostático muy refinado (véase p. 1145). Niveles bajos de Ca^{2+} sérico estimulan la formación de 1,25-dihidroxicolecalciferol, el cual facilita la absorción intestinal. Si la ingestión dietética de Ca^{2+} es insuficiente para mantener el nivel de calcio sérico, el 1,25-dihidroxicolecalciferol y la hormona paratiroidea estimulan la resorción ósea. La insuficiencia prolongada de calcio dietético da lugar casi siempre a una pérdida neta de calcio de los huesos.

No obstante, las necesidades dietéticas de Ca^{2+} varían considerablemente entre individuos debido a la existencia de otros factores que afectan a la disponibilidad de Ca^{2+}. Por ejemplo, se precisa la vitamina D para la óptima utilización del calcio. El exceso de proteína en la dieta puede romper el equilibrio del calcio al inducir una excreción de Ca^{2+} más rápida. El ejercicio aumenta la eficiencia de la utilización del calcio para la formación del hueso. Estudios sobre balance de calcio llevados a cabo con indios peruanos, que están expuestos muchas horas a la luz solar, realizan ejercicios considerables y subsisten con dietas vegetarianas, pobres en proteína, indican que sólo son necesarios 300–400 mg de Ca^{2+} por día. No obstante, estudios sobre el balance de calcio realizados en Estados Unidos demuestran de manera consistente unas necesidades más elevadas, que han situado la RDA en 1000–1300 mg $día^{-1}$.

Los síntomas principales de la **carencia de Ca^{2+}** son parecidos a los de la carencia de vitamina D, si bien también pueden darse con carencias marginales, otros síntomas, tales como calambres musculares. En Estados Unidos, una proporción significativa de mujeres y niños pertenecientes a familias con ingresos económicos escasos no tienen una ingestión adecuada de Ca^{2+}. Ello reviste una preocupación especial porque éstos son los grupos de población con necesidades especialmente elevadas de Ca^{2+}. Por esta razón, el Congreso de los Estados Unidos ha establecido el programa WIC (Women and Infant Children) para asegurar niveles de proteína,



APLICACIÓN CLÍNICA 27.8
Dieta y osteoporosis

Las controversias que han surgido sobre las relaciones entre la ingestión de calcio y la osteoporosis ilustran las dificultades con las que nos enfrentamos cuando se llevan a cabo recomendaciones dietéticas simples para problemas biológicos complejos. Si nos basamos en la publicidad televisiva y en la gran variedad de alimentos enriquecidos con calcio que se encuentran en el mercado, sería fácil suponer que todo lo que una mujer de edad avanzada necesita para evitar la osteoporosis es una dieta rica en calcio. Ello, sin embargo, equivaldría a cerrar la puerta del establo después que el caballo se hubiera escapado. Existe un consenso elevado sobre la idea de que la edad que va de los 10 a los 35 años de edad, en la que la densidad ósea va alcanzando su máximo, es el período más importante para reducir el riesgo de osteoporosis. La máxima densidad ósea obtenida durante estos años depende claramente de la ingestión de calcio y del ejercicio, siendo los huesos densos menos susceptibles de sufrir una falta grave de calcio después de la menopausia. Desgraciadamente, la mayoría de las mujeres estadounidenses consumen una cantidad de calcio demasiado pequeña durante estos años. La RDA para el calcio es de 1300 mg $día^{-1}$ (4 o más vasos de leche diarios) para las mujeres entre 11 y 18 años, 1000 mg $día^{-1}$ (3 o más vasos de leche diarios) para mujeres entre 19 y 50, y 1200 mg $día^{-1}$ (4 vasos de leche diarios) para mujeres de más de 50 años. La ingestión media de calcio en mujeres de esta edad es de sólo 500 mg $día^{-1}$. Resulta evidente que debe reforzarse la ingestión de calcio en este grupo.

Pero, ¿qué ocurre con las mujeres postmenopáusicas? Después de todo, la mayor parte de la propaganda parece dirigirse a este grupo. ¿Necesitan realmente más calcio? En 1994 el Comité de Consenso del NIH para la osteoporosis recomendaba a las mujeres postmenopáusicas el consumo de 1500 mg de calcio diarios, pero esta recomendación ha sido discutida enérgicamente por otros expertos en este campo. Examinando las pruebas, vemos que los estudios sobre el balance de calcio muestran que muchas mujeres postmenopáusicas necesitan 1200–1500 mg de calcio diarios para mantener un balance positivo (ingresar más calcio que el perdido por la orina), pero ello no implica necesariamente que el calcio sea almacenado en los huesos. De hecho, algunos estudios recientes no han podido demostrar una relación entre la ingestión de calcio y la pérdida de densidad ósea en mujeres postmenopáusicas, mientras que en otros estudios se ha observado un efecto protector. La situación de estos estudios se complica por el descubrimiento hecho sobre los diferentes efectos del calcio en los distintos tipos de huesos. Una ingestión de calcio entre 1000 y 1500 mg $día^{-1}$ parece retardar la disminución de densidad en el hueso cortical, como por ejemplo el que se encuentra en la cadera, la mano y algunas partes del antebrazo. Sin embargo, dosis similares parecen afectar poco o nada a la pérdida de densidad ósea del hueso trabecular que forma parte de la columna vertebral, la muñeca, y otras partes del antebrazo. Al menos parte de la confusión en los estudios originales parece ser el resultado de diferencias en el lugar empleado para medir la densidad ósea. Así, la relación entre incrementar la ingestión de calcio únicamente y el retraso en la pérdida del hueso en mujeres postmenopáusicas sigue siendo objeto de controversia. Es obvio que las mujeres de edad avanzada deben seguir las RDA para el calcio de su dieta. Con la reciente preocupación que suscita el contenido en grasa de los productos lácteos, la ingestión de calcio en este grupo parece seguir una tendencia decreciente más que creciente. Aun más, incluso con una terapia de sustitución de estrógenos, la ingestión de calcio no debe ser ignorada. Estudios recientes han demostrado que con ingestiones de calcio de entre 1000 y 1500 mg diarios, la dosis efectiva de estrógenos puede reducirse significativamente.

Si bien la publicidad y la mayor parte de literatura popular se centra en la ingestión de calcio, debemos también recordar que los huesos no están únicamente constituidos por calcio. Si la dieta es deficiente en otros nutrientes, la utilización de calcio para la formación del hueso se verá alterada. La vitamina C es necesaria para formar la matriz ósea, y el magnesio y el fósforo son una parte importante de la estructura del hueso. La vitamina K y diversos oligoelementos, que incluyen el cobre, zinc, manganeso y boro, son importantes para la formación del hueso. Por lo tanto, los suplementos de calcio pueden no ser utilizados óptimamente si la dieta global es inadecuada. La vitamina D es necesaria para la absorción y la utilización del calcio. Merece especial atención, ya que puede representar un problema particular para los individuos de edad avanzada (véase Apli. Clín. 27.9). Finalmente, para prevenir la pérdida de densidad ósea, un programa adecuado de ejercicios es tan importante como una terapia de sustitución de estrógenos y una dieta adecuada.

Schaafsma, G., Van Berensteyn, E. C. H., Raymakers, J. A. y Dursma, S. A. Nutritional aspects of osteoporosis. *World Rev. Nutr. Diet.* 49:121, 1987; Heaney, R. P. Calcium in the prevention and treatment of osteoporosis. *J. Intern. Med.* 231:169, 1992; y National Institutes of Health. *Optimal Calcium Intake.* NIH Consensus Statement, 12 (Nov. 4), 1994.

calcio y hierro adecuados para las familias indigentes con madres embarazadas o en lactancia o con niños pequeños.

Las encuestas dietéticas muestran que el 34–47% de la población de más de 60 años de edad consumen menos que la EAR para el Ca^{2+}. Éste es el grupo con mayor riesgo de desarrollar osteoporosis, que se caracteriza por la pérdida de la matriz ósea orgánica, así como por desmineralización progresiva de los huesos. Las causas de la **osteoporosis** son multifactoriales y en gran medida desconocidas, pero parece probable que parte del problema esté relacionado con el metabolismo del Ca^{2+} (véase Apli. Clín. 27.8). Estudios recientes sugieren que una ingesta inadecuada de Ca^{2+} puede tener como resultado una elevación de la presión sanguínea. A pesar de que esta hipótesis no se ha demostrado de manera concluyente, resulta ser de gran importancia, puesto que la mayor parte de las dietas bajas en sodio (recomendadas en pacientes con presión sanguínea alta) limitan en gran medida el consumo de productos lácteos, que son la principal fuente dietética de Ca^{2+} en la población norteamericana.

El magnesio es necesario para muchos enzimas

El **magnesio** se precisa para muchas actividades enzimáticas, en particular, aquellas que implican al ATP formando un complejo ATP–Mg^{2+}, y para la transmisión neuromuscular. Las cantidades de Mg^{2+} se reducen significativamente durante el tratamiento de los alimentos y las encuestas dietéticas recientes han demostrado que la ingestión media de Mg^{2+} en los países desarrollados está a menudo por debajo de la EAR. La carencia de magnesio se observa en condiciones de alcoholismo, uso de ciertos diuréticos y acidosis metabólica. Los síntomas principales de la **carencia de Mg^{2+}** son debilidad, temblores y arritmia cardíaca. Existen algunas pruebas de que el suplemento de Mg^{2+} puede ayudar a prevenir la formación de cálculos de oxalato cálcico en el riñón. En algunos estudios clínicos, pero no en todos, se ha demostrado que la suplementación con Mg^{2+} también disminuye la presión sanguínea y el reciente Health Professional Follow-up Study demostró un efecto inverso entre la ingestión de Mg^{2+} en la dieta y el riesgo total de apoplejía.

27.10 | OLIGOELEMENTOS

El hierro se reutiliza eficientemente

El metabolismo del **hierro** es singular en el sentido de que opera en su mayor parte como un sistema cerrado en el que los depósitos de hierro son reutilizados eficientemente por el cuerpo. Las pérdidas de hierro son mínimas (<1 mg día^{-1}), pero la absorción de hierro también es mínima incluso en las mejores condiciones. El hierro se encuentra normalmente en los alimentos en forma férrica unido a proteínas o ácidos orgánicos. Antes de que pueda tener lugar la absorción, el hierro se ha de separar de estos transportadores (proceso que se ve facilitado por las secreciones ácidas del estómago) y reducido a la forma ferrosa (proceso favorecido por el ácido ascórbico). Sólo el 10% del hierro de una dieta mixta media se absorbe habitualmente, pero se puede aumentar la eficiencia de la absorción hasta el 30% en la carencia grave de hierro. La absorción y metabolismo del hierro ya se han tratado previamente en el Capítulo 24 y se resume en la Figura 27.15.

Como componente de la hemoglobina y de la mioglobina, el hierro es necesario para el transporte de O_2 y CO_2. Como componente de los citocromos y de las proteínas con hierro no hemo, es preciso para la fosforilación oxidativa. Como componente del enzima lisosómico esencial mieloperoxidasa, es necesario para la fagocitosis adecuada y para matar a las bacterias mediante los neutrófilos. El síntoma mejor conocido de la carencia de hierro es una anemia microcítica hipocrómica. La **carencia de hierro** está también asociada con una disminución de la inmunocompetencia.

Suponiendo una eficiencia en la absorción del 10–15%, el Food and Nutrition Board ha establecido una asignación dietética recomendada de 10 mg día^{-1} para un varón adulto normal y de 15 mg día^{-1} para una mujer durante la menstruación. Para las mujeres embarazadas, estas asignaciones se elevan a 30 mg día^{-1}. Mientras que 10 mg de hierro se pueden obtener fácilmente de una dieta normal, 15 mg están en el límite y 30 mg no se pueden obtener prácticamente nunca. Las mejores fuentes dietéticas de hierro son las carnes, legumbres secas, frutos secos y productos de cereales enriquecidos.

La **anemia ferropénica** se considera la enfermedad nutricional más importante de los Estados Unidos. Los niños y las mujeres embarazadas necesitan hierro sufi-

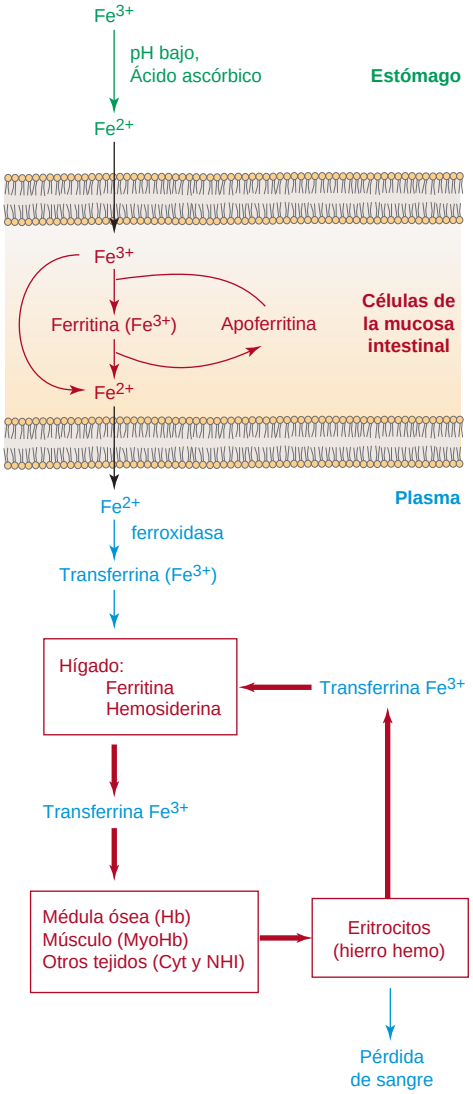


FIGURA 27.15
Visión global del metabolismo del hierro. Esta figura resume algunas de las características del metabolismo del hierro discutidas previamente en el Capítulo 24. Las flechas rojas indican que la mayor parte del hierro corporal se reutiliza eficientemente mediante esta ruta. Hb, hemoglobina; MyoHb, mioglobina; Cyt, citocromos y NHI, hierro no hemo.

ciente para permitir que aumente de manera continuada el volumen de sangre. Las mujeres en fase de menstruación pierden hierro a través de la sangre y las que se encuentran en período de lactancia lo hacen a través de la producción de lactoferrina (véase p. 1055). Así, la anemia ferropénica se da como problema principalmente en estos grupos de población. Existen encuestas dietéticas que indican que el 95% o más de los niños o de las mujeres en períodos de menstruación no obtienen suficiente hierro con la dieta. Las mediciones bioquímicas muestran un 10–25% de incidencia de anemia ferropénica en este mismo grupo. La anemia ferropénica es también un problema que se da en los ancianos, debido a la ingestión dietética insuficiente y al aumento de la frecuencia de aclorhidria.

Como la anemia ferropénica está extendida, los programas gubernamentales de intervención nutricional, tales como el programa WIC, han puesto de relieve los alimentos ricos en hierro. Existe preocupación entre algunos nutricionistas por el hecho de que se ha dado demasiada importancia a la carencia de hierro. Algunos estudios recientes sugieren que la ingestión de un exceso de hierro puede aumentar el riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Por ello, los suplementos de hierro y el consumo de alimentos reforzados con hierro pueden no ser adecuados para varones adultos y hembras postmenopáusicas. El **exceso de hierro** puede conducir a un estado poco frecuente denominado **hemocromatosis**, en el que los depósitos de hierro se encuentran en muchos tejidos en niveles anormalmente elevados. Esto puede conducir a una disfunción hepática, pancreática y cardíaca, así como a una pigmentación de la piel. La hemocromatosis se observa también de forma ocasional en anemias hemolíticas y enfermedad hepática.

El yodo se incorpora en las hormonas tiroideas

El **yodo** de la dieta se absorbe eficientemente y se transporta a la glándula **tiroides**, donde se almacena y utiliza para la síntesis de las hormonas tiroideas triyodotironina y tiroxina. Estas hormonas funcionan regulando el **índice metabólico basal** del adulto y el crecimiento y desarrollo del niño. Los peces marinos son las mejores fuentes naturales de yodo, y en tiempos pasados los grupos de población que vivían en el interior sufrían una enfermedad endémica carencial llamada **bocio**. El síntoma más característico del bocio es el aumento (a veces enorme) de la glándula tiroides. Dado que el yodo se ha añadido de manera rutinaria a la sal de mesa, el bocio se ha convertido en una enfermedad relativamente rara. Sin embargo, en algunas áreas del interior pueden aún observarse formas suaves de bocio en hasta un 5% de la población.

El zinc es un cofactor de muchos enzimas

La absorción de **zinc** parece ser proporcional a los niveles de **metalotioneína** existentes en las células de la mucosa intestinal. No se conoce con certeza el papel de la metalotioneína en el transporte del zinc; podría funcionar como tampón para iones zinc a medida que el metal atraviesa las células intestinales. Se han descrito hasta el momento más de 300 metaloenzimas con zinc, entre los que se cuentan proteínas reguladoras y RNA y DNA polimerasas. La carencia de zinc en los niños está marcada por crecimiento deficiente y por trastornos en el desarrollo sexual. Tanto en los niños como en los adultos, la carencia de zinc produce una curación deficiente de las heridas. El zinc también se halla presente en la gustina, un polipéptido de la saliva que parece ser necesario para el desarrollo normal de las papilas gustativas. Así, la carencia de zinc lleva también a una disminución de la percepción de los sabores. El zinc es necesario para la producción opcional de citoquinas por parte de los monocitos y las células T. Por ello, las carencias de zinc están asociadas también a trastornos de la función del sistema inmunitario.

Las pocas encuestas dietéticas que se han realizado indican que la ingestión de zinc puede estar en el límite en muchos individuos. Se ha demostrado que la suplementación con zinc mejora el estado inmunitario de las personas de edad. La **carencia de zinc** grave aparece principalmente en alcohólicos (especialmente si ya han desarrollado cirrosis), pacientes con enfermedad renal crónica o con enfermedades de malabsorción graves, y en ocasiones en personas después de nutrición parenteral total (TPN) prolongada. El síntoma temprano más característico de los pacientes con carencia de zinc sujetos a TPN es la dermatitis. A veces se utiliza el zinc de manera terapéutica para facilitar la curación de heridas, pudiendo utilizarse en el tratamiento de las úlceras gástricas.

El cobre es un cofactor de enzimas importantes

La absorción de **cobre** puede ser dependiente de la proteína metalotioneína, ya que un exceso en la ingestión de cobre o de zinc interfiere con la absorción del otro. El cobre se encuentra en una serie de metaloenzimas importantes, entre los que se encuentran la citocromo *c* oxidasa, la dopamina β-hidroxilasa, la superóxido dismutasa, la lisil oxidasa y la C_{18},Δ^9-desaturasa. La C_{18},Δ^9-desaturasa se encarga de la conversión del ácido esteárico (un ácido graso C_{18} saturado) en ácido oleico (un ácido graso C_{18} monoinsaturado). Ésta puede ser la causa por la que el ácido esteárico de la dieta no aumenta el colesterol sérico como hacen otros ácidos grasos saturados. La lisil oxidasa es necesaria para la conversión de ciertos residuos de lisina en el colágeno y la elastina en al-lisina, necesaria para el establecimiento de enlaces cruzados. Algunos de los síntomas de la **carencia de cobre** son la **hipercolesterolemia**, desmineralización de los huesos, leucopenia, anemia, fragilidad de las grandes arterias y desmielinización del tejido nervioso. La anemia parece ser debida a un defecto en el metabolismo del hierro, porque el enzima ferroxidasa que contiene cobre es necesario para la conversión del hierro desde el estado Fe^{2+} (forma en la que se absorbe) al estado Fe^{3+} (en cuya forma se puede unir a la proteína plasmática transferrina). La desmineralización ósea y la fragilidad de los vasos sanguíneos se pueden atribuir directamente a defectos en la formación del colágeno y de la elastina. La hipercolesterolemia puede estar relacionada con incrementos en la relación entre ácidos grasos saturados y monoinsaturados de la serie C_{18}, debido a una reducción en la actividad de la C_{18}, Δ^9-desaturasa.

Los estudios sobre el balance de cobre llevados a cabo con voluntarios indican unas necesidades mínimas de 1,0–2,6 mg día^{-1}. La RDA es 1,5–3 mg día^{-1}. En los Estados Unidos, la mayor parte de las encuestas dietéticas dan como resultado que la dieta media sólo proporciona 1 mg cuando se ingieren menos de 2000 cal día^{-1}. Esto es desconcertante, ya que en la población general se han identificado pocos síntomas de carencia de cobre. Se desconoce si existen carencias marginales de cobre muy extendidas o si los estudios sobre el balance de cobre son poco precisos. Habitualmente sólo se observan síntomas reconocibles de carencia de cobre como resultado de un exceso de ingesta de zinc y en el síndrome de Menke, enfermedad hereditaria relativamente rara ligada al cromosoma X y asociada con un defecto en el transporte de cobre. La enfermedad de Wilson, enfermedad autosómica recesiva, está asociada a una acumulación anormal de cobre en varios tejidos, y se puede tratar con penicilamina, que es un agente quelante de cobre de procedencia natural.

El cromo es un componente de la cromodulina

El **cromo** es un componente de la **cromodulina**, proteína de baja masa molecular que potencia los efectos de la insulina, presumiblemente facilitando la unión de la insulina a los receptores celulares. El síntoma principal de la **carencia de cromo** es un deterioro en la **tolerancia a la glucosa**, que resulta de la disminución de la efectividad de la insulina.

Se desconoce la frecuencia de la carencia de cromo. La RDA para el cromo se ha establecido en 50–200 μg día^{-1} para un adulto normal. Los cálculos más precisos indican que el consumo medio de cromo en Estados Unidos es de unos 30 μg día^{-1}. Desgraciadamente, la ingestión de este oligoelemento presenta amplias variaciones (5–100 μg día^{-1}), incluso en individuos que, por lo demás, consumen dietas equilibradas. Los individuos con más probabilidades de ingerir cantidades límite o bajas de cromo son aquellos que consumen dietas con pocas calorías o con muchos alimentos manipulados. Ha aparecido cierta preocupación en Estados Unidos por el hecho de que muchos de sus habitantes puedan presentar una carencia marginal de cromo.

El selenio es un eliminador de peróxidos

El **selenio** se encuentra en selenoproteínas como la **glutatión peroxidasa** y la **tiorredoxina reductasa**. Estas proteínas contienen uno o más residuos de selenocisteína, que se incorporan a través de un proceso co-traduccional peculiar. La glutatión peroxidasa destruye los peróxidos del citosol. Dado que el efecto de la vitamina E sobre la formación de peróxidos se limita principalmente a la membrana, tanto la glutatión peroxidasa como la vitamina E parecen ser necesarios para la eliminación eficiente de peróxidos. El selenio es uno de los pocos nutrientes que no es eliminado por la molturación de la harina y se cree que se encuentra en cantidades adecuadas en la dieta. No obstante, los niveles de selenio son muy bajos en el suelo de ciertas partes del territorio de Estados Unidos, por lo que los alimentos procedentes de es-

tas regiones tienen bajo contenido en selenio. Por fortuna, este efecto queda minimizado por el sistema actual de distribución de alimentos, que asegura que los alimentos comercializados en un área provengan de diversas regiones geográficas distintas. Un estudio clínico reciente sugiere que una suplementación con niveles de selenio superiores a la RDA podrían reducir el riesgo de determinados cánceres. Actualmente se están llevando a cabo otros estudios clínicos para evaluar esta hipótesis.

El manganeso, el molibdeno, el fluoruro y el boro también son importantes

El **manganeso** es un componente de la piruvato carboxilasa y, probablemente, también de otros metaloenzimas. El **molibdeno** es un componente de la xantina oxidasa (véase p. 840). Se sabe que el **fluoruro** refuerza los huesos y los dientes, siendo añadido habitualmente al agua de bebida. El **boro** puede también jugar un papel importante en la formación del hueso.

27.11 | LA DIETA ESTADOUNIDENSE: HECHOS Y FALACIAS

Mucho se ha dicho últimamente sobre el supuesto deterioro de la dieta estadounidense. ¿Es muy serio este problema? Está claro que los estadounidense actuales están comiendo muchos más alimentos preparados que sus antecesores. Estos alimentos difieren de los alimentos naturales en que tienen una mayor densidad calórica y una menor densidad nutritiva que los alimentos que reemplazan. No obstante, estos alimentos están suplementados de manera casi uniforme con hierro, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico y niveles bajos de ácido fólico. En muchos casos están incluso enriquecidos (habitualmente tanto para la promoción de ventas como por razones nutricionales) con hasta 11–15 vitaminas y minerales. Por desgracia, no resulta práctico reemplazar todos los nutrientes perdidos, especialmente los oligoelementos y los fitonutrientes, como los carotenoides. Los alimentos artificiales presentan un problema especial, en el sentido de que normalmente son incompletos en aspectos más sutiles. Por ejemplo, el queso artificial y los batidos artificiales que se venden en gran cantidad en Estados Unidos contienen normalmente la proteína y el calcio que serían de esperar del alimento que reemplazan, pero a menudo no contienen la riboflavina que se habría de obtener de estos productos. Las comidas de los restaurantes rápidos tienden a tener muchas calorías y grasas mientras que son pobres en ciertas vitaminas y oligoelementos. Por ejemplo, la comida rápida estándar proporciona más del 50% de las calorías que necesita el adulto medio durante todo el día, mientras que proporciona <5% de la vitamina A y <30% de biotina, ácido fólico y ácido pantoténico necesarios. Desgraciadamente, la mayor parte de la controversia en años recientes se ha centrado sobre si estas tendencias eran "buenas" o "malas". Esto no hace más que oscurecer el tema en cuestión. Obviamente, es posible obtener una dieta equilibrada que incluya alimentos preparados, artificiales y rápidos si se la compensa seleccionando alimentos para las comidas restantes que tengan una densidad calórica baja y que sean ricos en nutrientes. Sin tal compensación, la "dieta equilibrada" se convierte en una ficción.

27.12 | EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Después de repasar los micronutrientes principales y sus funciones bioquímicas, puede parecer que el proceso de evaluar el **estado nutricional** de un paciente individual sea una tarea descomunal. Quizá es mejor reconocer que existen tres factores que pueden contribuir a las deficiencias nutritivas: dieta pobre, malabsorción e incremento en las necesidades de nutrientes. El riesgo de aparición de deficiencias sintomáticas sólo es evidente cuando se dan dos o tres de los factores en una misma persona (Figura 27.16). Por ejemplo, los niños recién nacidos o de corta edad tienen más necesidad de hierro, calcio y proteínas. Las encuestas dietéticas demuestran que muchos de ellos consumen cantidades insuficientes de hierro, y que algunos consumen dietas bajas en calcio. La proteína no suele ser un problema, a no ser que los niños sean criados como vegetarianos estrictos. Así, para la mayor parte de los niños, los factores nutritivos más importantes son el hierro y el calcio.

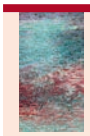
FIGURA 27.16
Factores que afectan al estado nutricional individual.
Representación esquemática de tres factores de riesgo importantes en la determinación del estado nutricional. Una persona situada en la periferia correría un riesgo muy bajo de sufrir deficiencias nutricionales, mientras que las personas situadas en las áreas verde, naranja, lila o centrales serían mucho más propensas a experimentar algunos síntomas de carencia nutricional.

Las mujeres jóvenes suelen consumir dietas bajas en hierro, calcio, magnesio, vitamina B_6, ácido fólico y zinc—todos los cuales se precisan en mayor cantidad durante el embarazo y la lactancia. Las mujeres adultas suelen consumir dietas con bajos contenidos en calcio, a pesar de que pueden tener una necesidad particularmente elevada de él para prevenir la pérdida rápida de hueso. Finalmente, los ancianos poseen necesidades nutricionales propias (véase Apli. Clín. 27.9), y tienden a ingerir relativamente pocos nutrientes a causa de sus ingresos bajos, pérdida de apetito y pérdida de la capacidad para preparar una variedad amplia de alimentos. Son también más propensos a sufrir problemas de malabsorción y a emplear una elevada cantidad de medicamentos que aumentan las necesidades nutritivas (Tabla 27.1).

Las **enfermedades** y **el estrés metabólico** producen a menudo un aumento de la demanda o un descenso de la utilización de ciertos nutrientes. Por ejemplo, las enfermedades que producen una malabsorción de las grasas crean un problema particular con la absorción del calcio y de las vitaminas liposolubles. Otras enfermedades de malabsorción pueden dar lugar a deficiencias de muchos nutrientes, en función de la enfermedad de malabsorción en concreto. Las enfermedades hepática y renal pueden impedir la activación de la vitamina D y el almacenamiento o utilización de muchos otros nutrientes, entre los que se incluyen la vitamina A, vitamina B_{12} y ácido fólico. Las enfermedades graves o los traumas incrementan la necesidad de calorías, proteínas y, posiblemente, de algunos micronutrientes tales como la vitamina C y ciertas vitaminas del grupo B. La utilización prolongada de muchos fármacos en el tratamiento de enfermedades crónicas puede afectar a la necesidad de ciertos micronutrientes. En la Tabla 27.1 se resumen algunos ejemplos de ello.

TABLA 27.1 Interacciones fármacos–nutrientes

Fármaco	*Carencias nutricionales potenciales*
Alcohol	Tiamina Ácido fólico Vitamina B_6
Anticonvulsivos	Vitamina D Ácido fólico Vitamina K
Colestiramina	Vitaminas liposolubles Hierro
Corticoides	Vitamina D y calcio Zinc Potasio
Diuréticos	Potasio Zinc
Isoniazida	Vitamina B_6
Contraconceptivos orales y estrógenos	Vitamina B_6 Ácido fólico y B_{12}



APLICACIÓN CLÍNICA 27.9
Requerimientos nutricionales en personas de edad avanzada

De continuar las tendencias actuales, uno de cada cinco estadounidenses será mayor de 65 años alrededor del 2030. Debido a este envejecimiento previsto de la población de Estados Unidos, existe un creciente interés en definir los requerimientos nutricionales de la población de edad avanzada. Estudios recientes muestran una alteración en las necesidades de varios nutrientes esenciales. Por ejemplo, se ha demostrado que la absorción y utilización de vitamina B_6 disminuyen con la edad. Las encuestas dietéticas han demostrado de forma consistente que la vitamina B_6 es un nutriente problemático para la mayoría de estadounidenses, y las personas de edad avanzada no parecen constituir una excepción a ello. Gran parte de la población anciana obtiene de su dieta menos del 50% de la RDA para la B_6. La deficiencia de vitamina B_{12} es también más corriente entre la tercera edad. Muchos adultos de edad avanzada desarrollan gastritis atrófica, que conduce a una disminución en la producción de ácido por el estómago. Este fenómeno, junto con una tendencia hacia una menor producción de factor intrínseco, conduce a una baja absorción de vitamina B_{12}. Estudios recientes han sugerido que los niveles elevados del aminoácido homocisteína pueden representar un factor de riesgo de ateroesclerosis. La homocisteína se suele metabolizar a metionina y cisteína en reacciones que precisan ácido fólico, B_{12} y B_6. También la vitamina D puede representar un problema. Un gran número de personas mayores no permanecen mucho tiempo bajo la luz del sol, y para empeorar la situación, tanto la conversión del 7-deshidrocolesterol en vitamina D en la piel como la del 25-(OH)D en 1,25-$(OH)_2$D en el riñón disminuyen con la edad. Estos factores se combinan a menudo para producir deficiencias significativas de 1,25-$(OH)_2$D en esta población, lo cual puede a su vez conducir a un balance de calcio negativo. Tales cambios no parecen ser la causa principal de osteoporosis, pero seguramente pueden contribuir a la misma.

Existen ciertas pruebas de un aumento en los requerimientos de cromo y zinc. El cromo no es especialmente abundante en la dieta de Estados Unidos, y muchas personas de edad avanzada parecen tener dificultades en convertir el cromo de la dieta en cromodulina biológicamente activa. No está clara la importancia clínica de tales observaciones, si bien la deficiencia de cromo podría contribuir a la diabetes de establecimiento tardío. De forma similar, las encuestas dietéticas muestran que la mayor parte de las personas de edad avanzada consumen entre la mitad y dos tercios de la RDA para el zinc. Estados tales como la gastritis atrófica pueden también interferir en la absorción de zinc. Los síntomas de deficiencia de zinc incluyen la pérdida de agudeza gustativa, dermatitis y debilitación del sistema inmunitario. Todos estos síntomas son comunes en la tercera edad, y se ha sugerido que a ello podría contribuir la deficiencia de zinc.

Sin embargo, no todo son malas noticias. La absorción de vitamina A aumenta con la edad, y la capacidad del hígado para eliminar esta vitamina de la sangre disminuye, de modo que la misma permanece en la circulación durante un período de tiempo mayor. De hecho, con la edad, no sólo disminuye la necesidad de vitamina A, sino que las personas mayores necesitan asimismo evitar de forma cuidadosa la toxicidad de la vitamina A. Si bien ello no restringe la elección de alimentos o de suplementos multivitamínicos, estas personas deben evitar generalmente suplementos de vitamina A adicionales.

Munro, H. N., Suter, P. M. y Rusell, R. M. Nutritional requirements of the elderly. *Annu. Rev. Nutr.* 7:23, 1987; Russell, R. M. y Suter, P. M. Vitamin requirements of elderly people: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 58:4, 1993; Ubbink, J. B., Vermoak, W. J., van der Merne, A. y Becker, P. J. Vitamin B_{12}, vitamin B_6 and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:47, 1993; Joosten, E., van der Berg, A., Riezler, R., Neurath, H. J., Linderbaum, J., Stabler, S. P. y Allen, R. H. Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B_{12}, folate and vitamin B_6 occur commonly in elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.* 58:468,1993.

¿Quién se encuentra, por tanto, en riesgo nutricional? Obviamente la respuesta depende de muchos factores. El consejo nutricional se convertirá en una parte importante del tratamiento de lactantes, niños y mujeres embarazadas o en época de lactancia. Un análisis breve de la historia dietética y el consejo nutricional posterior también serán importantes en el trato con pacientes de alto riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

Asignaciones dietéticas recomendadas

Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences. *Recommended Daily Allowances,* 10th ed. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1989.

Food y Nutrition Board of the National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B_6, folate, vitamin B_{12}, pantothenic acid, biotin, and choline. www.nap.edu, 1999.

Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. www.nap.edu, 2000.

Yates, A. A., Schlicker, S. A. y Suitor, C. W. Dietary reference intakes: the basis for the recommendation for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J. Am. Diet. Assoc.* 98:699, 1998.

Vitamina A

Goodman, D. S. Vitamin A and retinoids in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 310:1023, 1984.

Thurnham, D. I. y Northrop-Clews, C. A. Optimal nutrition: vitamin A and the carotenoids. *Proc. Nutr. Soc.* 58:449, 1999.

van Poppel, G. y Goldbohm, R. A. Epidemiolgic evidence for β-carotene and cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1393S,1995.

Vitamina D

Darwish, H. y DeLuca, H. F. Vitamin D-regulated gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 3:89,1993.

DeLuca, H. F. The vitamin D story. A collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* 2:224, 1988.

Langman, C. B. New developments in calcium and vitamin D metabolism. *Curr. Opin. Pediatr.* 12:135, 2000.

Vitamina E

Bieri, J. G., Coresh, L. y Hubbard, V. S. Medical uses of vitamin E. *N. Engl. J. Med.* 308:1063, 1983.

Brizeluis-Flohe, R. y Traber, M.G. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13:1145, 1999.

Das, S. Vitamin E in the genesis and prevention of cancer. A review. *Acta Oncol.* 33:615, 1994.

Meydani, S. N., Wu, D., Santos, M. S. y Hayek, M. C. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1462S, 1995.

Stampfer, M. J. y Rimm, E. B. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1365S,1995.

Tribble, D. L. Antioxidant consumption and the risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and β-carotene. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 99:591, 1999.

Vitamina K

Binkley, N. C. y Suttie, J. W. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J. Nutr.* 125:1812,1995.

Lipsky, J. J. Nutritional sources of vitamin K. *Mayo Clin. Proc.* 69:462,1994.

Nelsestuen, G. L., Shah, A. M. y Harvey, S. B. Vitamin K—dependent proteins. *Vitam. Horm.* 58:355, 2000.

Vitamina B6

Merril, A. H. Jr. y Henderson, J. M. Diseases associated with defects in vitamin B_6 metabolism or utilization. *Annu. Rev. Nutr.* 7:137, 1987.

Tully, D. B., Allgood, V. E. y Cidlowski, J. A. Modulation of steroid receptor-mediated gene expression by vitamin B_6. *FASEB J.* 8:343,1994.

Folato

Landgren, F., Israelsson, B., Lindgren, A., Hultsberg, B., Anderson, A. y Brettstrom, L. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effects of folic acid. *J. Intern. Med.* 237:381, 1995.

McNulty, H., Cuskelly, G. J. y Wood, M. Response of red blood cell folate to intervention: implications for folate recommendations for the prevention of neural tube defects. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(suppl):13085, 2000.

Milunsky, A., Jick, H., Jick, S. S., Bruell, C. L., MacLaugin, D. S., Rothman, K. J. y Willet, W. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 262:2847,1989.

Vitamina B_{12}

Seethoram, B., Bose, S. y Li, N. Cellular import of cobalamine (vitamin B_{12}). *J. Nutr.* 129:1761, 1999.

Weir, D. G. y Scott, J. M. Brain function in the elderly: role of vitamin B_{12} and folate. *Br. Med. Bull.* 55:669, 1999.

Vitamina C

Simon, J. A. Vitamin C and cardiovascular disease: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 11:107, 1992.

Hemila, H. y Douglas, R. M. Vitamin C and acute respiratory infections. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3:756, 1999.

Third International Conference on Vitamin C. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 498:1, 1987.

Simon, J. A. Vitamin C and cardiovascular disease: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 11:107,1992.

Colina

Food and Nutrition Board, *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B_6, Folate, Vitamin B_{12}, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.* Washington, DC: National Academy of Science Press, 1999.

Calcio

Hatton, D. C. y McCarron, D. A. Dietary calcium and blood pressure in experimental models of hypertension. *Hypertension*, 23:513,1994.

National Institutes of Health. *Optimal Calcium Intake.* NIH Consensus Statement, Vol. 12, No. 4, 1994.

Hierro

Dollman, P. R. Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 6:13,1986.

Cromo

Mertz W. Chromium in human nutrition: a review. *J. Nutr.* 123:626,1993.

Vincent, J. B. The biochemistry of chromium. *J. Nutr.* 130:715, 2000.

Selenio

Ganther, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*. 20:1657, 1999.

Otros oligoelementos

Symposium on metal metabolism and disease. *Clin. Physiol. Biochem.* 4:1, 1986.

Encuestas dietéticas

Block, G. Dietary guidelines and the results of food consumption surveys. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:3565,1991.

Kritchevsy, D. Dietary guidelines. The rationale for intervention. *Cancer* 72:1011,1993.

Pao, E. M. y Mickle, S. J. Problem nutrients in the United States. *Food Technol.* 35:58, 1981.

PREGUNTAS | C. N. ANGSTADT

Preguntas de elección múltiple

1. Las asignaciones dietéticas recomendadas (RDA):
   A. son comunes para todos los individuos.
   B. satisfacen necesidades dietéticas específicas surgidas a partir de enfermedades crónicas.
   C. cubren todas las necesidades nutricionales.
   D. definen niveles óptimos de nutrientes.
   E. son únicamente útiles tomadas como guías generales cuando se evalúa la adecuación de las dietas.

2. La Necesidad Media Estimada (EAR) de un nutriente es:
   A. lo mismo que la RDA de ese nutriente.
   B. una cantidad que debería satisfacer la necesidad de la mitad de los individuos sanos de un grupo determinado.
   C. está basada en la ingestión de nutriente observada en un grupo determinado.
   D. el nivel más alto de nutriente que se considera que no representa un riesgo o efectos adversos sobre la salud de una población determinada.
   E. dos desviaciones estándar más alta que la RDA.

3. Entre los efectos de la vitamina A se incluyen todos los siguientes, EXCEPTO:
   A. prevenir la anemia.
   B. actuar como antioxidante.
   C. participar en la diferenciación celular.
   D. participar en el ciclo visual.
   E. inducción de determinados cánceres.

4. El ácido ascórbico se puede relacionar con todo lo siguiente, EXCEPTO:
   A. la absorción del hierro.
   B. la formación del hueso.
   C. enfermedades renales agudas cuando se ingiere en dosis elevadas.
   D. cicatrización de heridas.
   E. participación en reacciones de hidroxilación.

5. Durante la evaluación de la adecuación de la dieta de un individuo:
   A. la edad del individuo suele ser poco relevante.
   B. el trauma hace disminuir la actividad, y por consiguiente disminuyen las necesidades calóricas, y posiblemente de algunos micronutrientes.
   C. el historial de la ingesta de un individuo durante 24 horas proporciona bases adecuadas para realizar un diagnóstico.
   D. deben tenerse en cuenta las medicaciones administradas durante la evaluación.
   E. el intestino es el único órgano cuyo estado de salud ejerce una influencia significativa sobre el estado nutricional.

Respuestas a que hacen referencia las preguntas 6–10.

   A. calcio.
   B. hierro.
   C. yodo.
   D. cobre.
   E. selenio.

6. La absorción está inhibida por el exceso de zinc en la dieta.
7. El exceso de proteína en la dieta provoca su excreción rápida.
8. El riesgo de carencia nutricional es elevado en niños de corta edad.
9. Las dietas no suplementadas para aquellas poblaciones que habitan en zonas interiores pueden resultar deficientes.
10. Es un componente esencial de la glutatión peroxidasa.

Preguntas 11 y 12: La fibrosis quística es una disfunción generalizada de las glándulas exocrinas que conduce a la formación de un mucus viscoso que tapona varios conductos. Las infecciones pulmonares son comunes y son, habitualmente, la causa inmediata de la muerte. No obstante, los pacientes con fibrosis quística también tienen problemas de malabsorción graves, ya que existe un déficit de enzimas pancreáticos y también puede darse una obstrucción parcial del conducto biliar común. La malabsorción de grasas, vitaminas liposolubles y calcio es el problema más común, pero no el único. Los pacientes tienen unas necesidades proteicas y energéticas incrementadas a causa de las infecciones crónicas.

11. Los niveles séricos de calcio suelen ser normales a pesar de la absorción subóptima de calcio y de la carencia de vitamina D. El calcio sérico es mantenido:
   A. por unos niveles bajos de de hormona paratiroidea (PTH) que inhiben la excreción de calcio.
   B. por un aumento de la calcitonina.
   C. por una resorción del hueso incrementada, la cual es estimulada por PTH elevada.
   D. porque el riñón reabsorbe calcio de la orina.
   E. por la falta de 1,25-dihidroxi vitamina D, que impide que el hueso tome el calcio de la sangre.

12. Los pacientes con fibrosis quística toman frecuentemente antibióticos a causa de las infecciones. Los antibióticos exacerban el problema de la malabsorción de grasas para la obtención de:
   A. vitamina A.
   B. vitamina C.
   C. vitamina D.
   D. vitamina E.
   E. vitamina K.

Preguntas 13 y 14: Los alcohólicos crónicos corren un riesgo de múltiples anormalidades nutricionales a causa de una dieta pobre, alteraciones patológicas del tracto gastrointestinal, que conducen a problemas de malabsorción, y destrucción grave del hígado, que interfiere con la activación y el almacenamiento de ciertos nutrientes. Son comunes los síntomas neurológicos asociados con carencias de tiamina o piridoxina y los problemas hematológicos asociados con carencias de folato o de piridoxina.

13. La generación de energía celular se ve seriamente comprometida cuando se da una carencia de tiamina, porque el TPP es:
   A. un cofactor muy importante en las reacciones de oxidación-reducción.
   B. un cofactor esencial de la piruvato y α-cetoglutarato deshidrogenasas.
   C. un cofactor de la transcetolasa.
   D. necesario para utilizar los aminoácidos para la obtención de energía a través de la transaminación.
   E. necesario para la oxidación del alcohol.

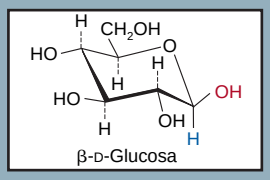
14. El alcohol perjudica la absorción y el almacenamiento de folato. La eritropoyesis megaloblástica tiene lugar porque las células se detienen en la fase S, ya que la síntesis de DNA está inhibida. En la carencia de folato, la síntesis de DNA está inhibida porque el tetrahidrofolato es necesario para:
   A. la síntesis de nucleótidos purínicos y dTMP.
   B. la conversión de homocisteína en metionina.
   C. la utilización de la vitamina B_{12}.
   D. todo lo anterior.
   E. nada de lo anterior.

Problemas

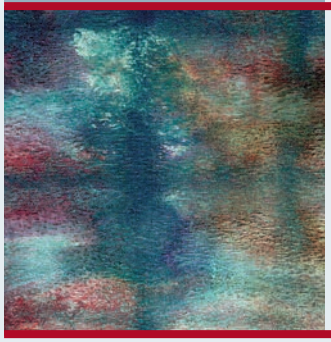
15. Los trastornos neurológicos que se observan en la carencia de vitamina B_{12} son debidos a la desmielinización progresiva del tejido nervioso. ¿Cómo interfiere la falta de B_{12} en la formación de la vaina de mielina?
16. ¿En qué reacción química participa la vitamina K? ¿Cómo está implicada esta reacción en la coagulación de la sangre y en la formación del hueso?

RESPUESTAS

1. **E** Las RDA deberían satisfacer las necesidades de aproximadamente el 97% de la población, pero no tienen en cuenta necesidades especiales. A: Las RDA están diseñadas para la mayoría de los individuos; pero existen excepciones. B: Las enfermedades suelen variar las necesidades de la dieta. C: Algunas necesidades nutricionales pueden ser aún desconocidas; ni siquiera están claramente descritas las necesidades de todos los nutrientes conocidos. D: Los niveles óptimos de los nutrientes son difíciles de definir; dependen de la definición de óptimo.
2. **B** Éste es el primer paso en la definición de pautas nutricionales. A, E: La RDA se establece a dos desviaciones estándar por encima de la EAR. C: A ésto se le llama Ingestión Adecuada (AI). D: Ésto es el Nivel de Ingestión Máxima Tolerable (UL).
3. **E** Puede tener efectos protectores contra algunos cánceres. A: El retinil fosfato sirve como dador de glucosilos en la síntesis de ciertas glucoproteínas, que incluyen la transferrina. B: Diversos carotenoides son antioxidantes. C: El retinol y el ácido retinoico pueden funcionar como hormonas esteroides. D: El retinol se cicla entre las formas Δ^{11}-cis y todo-trans.
4. **C** Se ha especulado, no a partir de estudios diseñados para arrojar luz sobre este aspecto, que los niveles elevados de ácido ascórbico pueden dar lugar a cálculos renales de oxalato. A: El ácido ascórbico colabora en la absorción del hierro mediante la reducción de éste. B: El ácido ascórbico es esencial para la síntesis de colágeno, que es crítico para la formación del hueso. D y E: El ácido ascórbico es necesario para la hidroxilación de los residuos de lisina y prolina en el protocolágeno y, por consiguiente, se requiere para la cicatrización de heridas.
5. **D** Los corticoesteroides estimulan la inactivación de la vitamina D. La isoniazida afecta a la B_6, al igual que los contraconceptivos orales. A: Se pueden dar diferencias espectaculares en distintas edades. B: Los traumas aumentan las necesidades calóricas y, posiblemente, las necesidades de determinados micronutrientes. C: No se puede estar seguro de que una historia dietética de 24 h sea exacta o bien representativa de la dieta típica de un individuo. E: Si bien el intestino debe funcionar correctamente para absorber suficientes nutrientes, típicamente se requieren cambios metabólicos adicionales. El metabolismo de la vitamina D por el hígado y el riñón y la conversión del β-caroteno en vitamina A son un ejemplo estas interacciones entre órganos.
6. **D** Estos dos probablemente comparten la misma proteína, la metalotioneína.
7. **A** Ésta es una preocupación en una dieta que contiene mucha más proteína de la necesaria.
8. **B** El crecimiento rápido en los niños provoca grandes demandas de hierro.
9. **C** El problema es raro en los EE.UU. debido al uso normal de sal yodada.
10. **E** El selenio está unido a un residuo de cisteína.
11. **C** La PTH promueve la resorción del hueso e inhibe la excreción de calcio. A: La PTH se eleva cuando el nivel de vitamina D es bajo. B: La calcitonina elevada es una respuesta a calcio sérico elevado. D: El riñón no hace esto. E: La 1,25-dihidroxi vitamina D promueve la resorción ósea, pero su falta no afecta necesariamente a la capacidad del hueso para tomar calcio de la sangre.
12. **E** Parte de nuestra vitamina K se obtiene a partir de la síntesis bacteriana en el intestino, la cual se destruye por acción de los antibióticos. A, C, D: Todas éstas requieren una absorción de grasas adecuada, pero provienen de los alimentos, no de bacterias intestinales. B: La vitamina C es hidrosoluble.
13. **B** La piruvato deshidrogenasa es muy sensible a la carencia de tiamina y se encuentra en la ruta principal para la obtención de energía a partir de glúcidos y diversos aminoácidos. A, E: Las reacciones de oxidación-reducción utilizan cofactores derivados del ácido nicotínico o la riboflavina. C: El TPP es un cofactor de la transcetolasa, pero este enzima se encuentra en la ruta de las pentosas monofosfato, la cual no es una de las rutas energéticas principales. D: Este cofactor se deriva de la piridoxina.
14. **A** La síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos y la conversión de dUMP a dTMP requieren tetrahidrofolato. Estos componentes son necesarios para la síntesis del DNA. B: El tetrahidrofolato es necesario en este proceso, pero el proceso no está involucrado en la síntesis de DNA. C: La vitamina B_{12} es necesaria para la liberación de tetrahidrofolato a partir de N^5-metiltetrahidrofolato, pero esto no forma parte de la síntesis de DNA.
15. Una de las reacciones en las que participa la vitamina B_{12} es la conversión de metilmalonil CoA en succinil CoA (un paso del catabolismo de la valina y la isoleucina). El metilmalonil Coa es un inhibidor competitivo del malonil Coa en la biosíntesis de ácidos grasos, la cual es necesaria para el mantenimiento de la vaina de mielina. En segundo lugar, el metilmalonil CoA se puede usar en la síntesis de ácidos grasos, dando lugar a la formación de ácidos grasos ramificados que podrían romper la estructura normal de la membrana.
16. La vitamina K es necesaria para la carboxilación de residuos de ácido glutámico específicos en determinadas proteínas, para dar lugar a residuos de ácido γ-carboxiglutámico. En la coagulación sanguínea, este paso es necesario para la conversión de la preprotrombina en protrombina. En la formación del hueso, esto se requiere para formar residuos fijadores de calcio en la proteína osteocalcina.



APÉNDICE



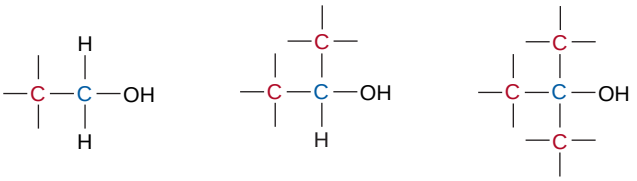
REPASO DE QUÍMICA ORGÁNICA

Carol N. Angstadt

GRUPOS FUNCIONALES

Alcoholes

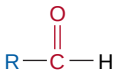
La fórmula general de los **alcoholes** es R—OH, en la que R es un grupo alquilo o arilo. Se clasifican en *primarios, secundarios* o *terciarios* según que el carbono que está unido al grupo hidroxilo (—OH) esté enlazado con uno, dos o tres carbonos más, respectivamente:



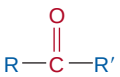
Aldehídos y cetonas

Los **aldehídos** y **cetonas** contienen un grupo carbonilo:

Los *aldehídos* son

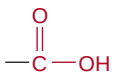


y las *cetonas* tienen dos grupos alquilo unidos al grupo carbonilo

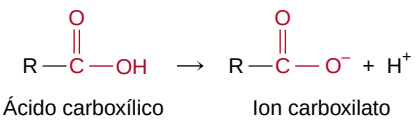


Ácidos y anhídridos de ácido

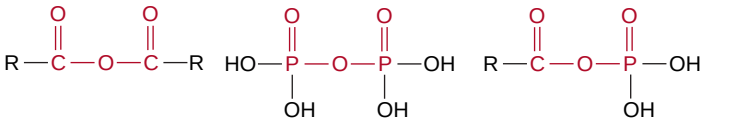
Los **ácidos carboxílicos** contienen el grupo funcional



(—COOH). Los ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos contienen dos y tres grupos carboxilo, respectivamente. Un ácido carboxílico disuelto en agua se ioniza formando el ion carboxilato cargado negativamente:

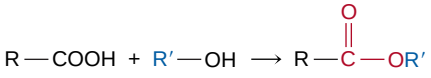


Los nombres de los ácidos carboxílicos suelen terminar en "-ico" y el ion carboxilato en "-ato". Los **anhídridos de ácido** se forman cuando dos moléculas de ácido reaccionan con pérdida de una molécula de agua. Pueden formarse anhídridos de ácido entre dos ácidos orgánicos, dos ácidos inorgánicos o un ácido orgánico y un ácido inorgánico:



Ésteres

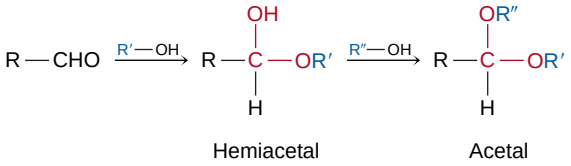
Los **ésteres** se forman por reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol:



Los ésteres pueden formarse entre un ácido inorgánico y alcohol orgánico como, por ejemplo, la glucosa-6-fosfato.

Hemiacetales, acetales y lactonas

La reacción entre un aldehído y un alcohol da lugar a un **hemiacetal**, el cual puede reaccionar con otra molécula de alcohol para dar un **acetal**:



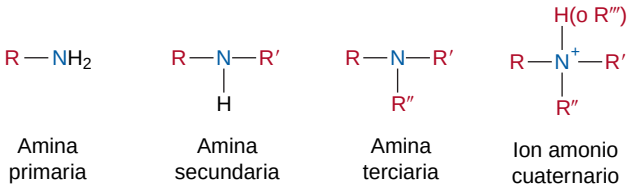
Las **lactonas** son ésteres cíclicos que se forman cuando reaccionan un grupo ácido y un grupo alcohol de la misma molécula, lo que generalmente implica que se forme un anillo de cinco o seis átomos.

Compuestos insaturados

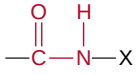
Los **compuestos insaturados** son aquellos que contienen uno o más enlaces múltiples carbono-carbono, como, por ejemplo, un doble enlace: —C═C—.

Aminas y amidas

Las **aminas** R—NH_2 son derivados orgánicos del NH_3 y se clasifican en *primarias*, *secundarias* o *terciarias*, según sea el número de grupos alquilo (R) unidos al nitrógeno. Cuando se enlaza un cuarto sustituyente al átomo de nitrógeno, la especie está cargada positivamente y se denomina *ion amonio cuaternario*:



Los **amidas** contienen el grupo funcional

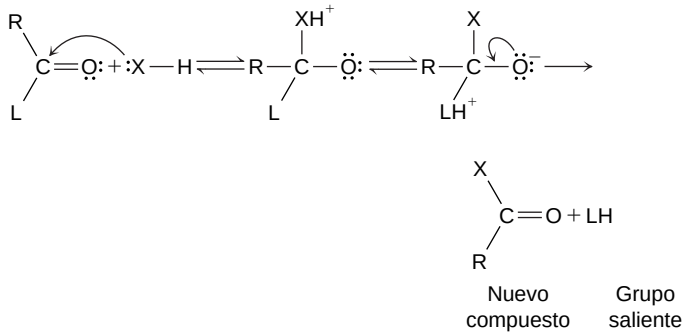


donde X puede ser H (sencilla) o R (*N* sustituida). El grupo carbonilo proviene de un ácido, y el *N* de una amina. Si ambos grupos funcionales provienen de un aminoácido, el enlace amida se conoce como **enlace peptídico**.

TIPOS DE REACCIONES

Sustituciones nucleofílicas en un carbono acílico

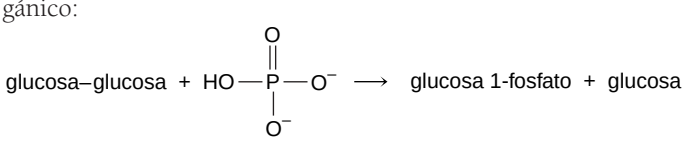
Si el carbono acílico está situado en un grupo carboxílico, el grupo saliente es una molécula de agua. La sustitución nucleofílica en los ácidos carboxílicos suele exigir la presencia de un catalizador o la conversión a un intermedio más reactivo; esto ocurre biológicamente mediante catálisis enzimática. X—H puede ser un alcohol (R—OH), amoníaco, amina ($R—NH_2$) u otro compuesto acilo. Entre los tipos de sustituciones nucleofílicas se cuentan la *esterificación*, la formación de *enlaces peptídicos* y la formación de *anhídridos de ácido.*



Reacciones de hidrólisis y fosforólisis

Hidrólisis significa rotura de un enlace a cargo del agua:

La hidrólisis suele ser catalizada por un ácido o por una base. La *fosforólisis* es la rotura de un enlace a cargo del fosfato inorgánico:

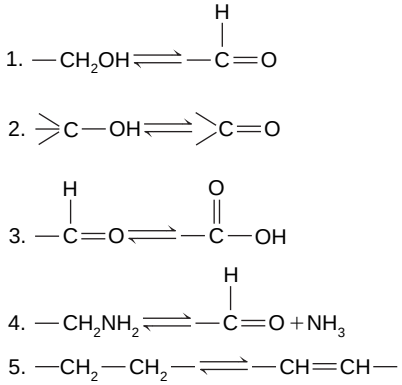


Reacciones de oxidación-reducción

La **oxidación** es pérdida de electrones; la **reducción** es ganancia de electrones. Los siguientes son ejemplos de oxidaciones:

1. Fe^{2+} + aceptor → Fe^{3+} + aceptor · e^-
2. S(ustrato) + O_2 + DH_2 → S—OH + H_2O + D
3. S—H_2 + aceptor → S + aceptor · H_2

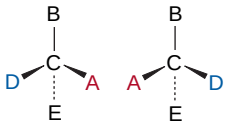
Estos son algunos ejemplos de los cambios de grupo que acontecen en las reacciones de oxidación-reducción:



ESTEREOQUÍMICA

Los **estereoisómeros** son compuestos con las mismas fórmulas moleculares y el mismo orden de unión de los átomos constituyentes, pero con diferentes disposiciones de estos átomos en el espacio.

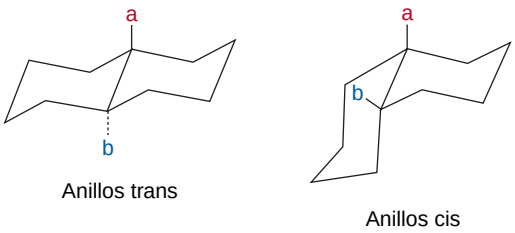
Los **enantiómeros** son estereoisómeros en los que un isómero es la imagen especular del otro, lo que requiere la presencia de un átomo quiral. Un carbono quiral (denominado también átomo asimétrico) es aquel que está unido a cuatro grupos diferentes:



Para distinguir un enantiómeros del otro se utilizan las denominaciones *R* y *S* o *D* y *L*. El número máximo de estereoisómeros posibles es de 2^n, siendo *n* el número de carbonos quirales. Una molécula con más de un centro quiral será aquiral si tiene un punto o plano de simetría.

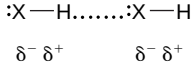
Los **diastereómeros** son estereoisómeros que no son entre sí imágenes especulares y que no necesitan contener átomos quirales. Los **epímeros** son diastereómeros que contienen más de un carbono quiral y difieren en configuración en *tan sólo un* carbono asimétrico.

Los **anómeros** son una forma especial de epímeros de los glúcidos en los que la diferencia se sitúa específicamente alrededor del carbono anomérico (véase p. 1173). Los diastereómeros también pueden darse en moléculas en las que existe una rotación restringida en los enlaces carbono-carbono. Los dobles enlaces presentan **isomería cis-trans**. El doble enlace se encuentra en la configuración cis si los dos grupos finales de la cadena más larga que contiene el doble enlace están del mismo lado y en configuración trans si los dos extremos de la cadena más larga se encuentran en lados opuestos. Los sistemas de anillos fusionados, como los encontrados en esteroides (véase p. 1177), presentan también isomería cis-trans.



TIPOS DE FUERZAS IMPLICADAS EN LAS ESTRUCTURAS MACROMOLECULARES

Un **enlace** o **puente de hidrógeno** es una atracción dipolo-dipolo entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo y un par de electrones no enlazante situado en otro átomo electronegativo:



Los enlaces de hidrógeno importantes en estructuras macromoleculares se dan entre dos nitrógenos, dos oxígenos o un oxígeno y un nitrógeno.

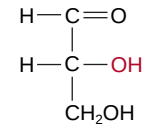
Una **interacción hidrofóbica** es la asociación de grupos no polares en un medio polar. Las fuerzas de *van der Waals* consisten en interacciones entre dipolo y dipolo inducido entre dos grupos no polares. Un residuo no polar disuelto en agua induce una superficie de solvatación altamente ordenada y termodinámicamente desfavorable. La interacción entre residuos no polares, con exclusión del agua, hace aumentar la entropía del sistema y es termodinámicamente favorable.

Las **interacciones iónicas (electrostáticas)** entre grupos cargados pueden ser atractivas si las cargas son de signos opuestos o repulsivas si son del mismo signo. La fuerza de la atracción electrostática en el interior de una molécula de proteína puede ser alta. La mayoría de los grupos cargados en la superficie de una proteína interaccionan con el agua más que con los demás grupos. Un **enlace disulfuro** (—S—S—) es un enlace covalente formado por la oxidación de dos grupos sulfhidrilo (SH).

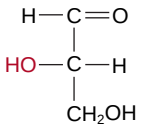
GLÚCIDOS

Los **glúcidos** son polihidroxi aldehídos o cetonas o derivados de éstos. Los **monosacáridos** (azúcares sencillos) son los glúcidos que no pueden ser hidrolizados en compuestos más sencillos. El nombre de un tipo de monosacáridos incluye el tipo de función, un prefijo griego que indica el número de carbonos y la terminación -osa: por ejemplo, *aldohexosa* es un aldehídos de seis carbonos y *cetopentosa* es una cetona de cinco carbonos. Los monosacáridos pueden reaccionar con otras moléculas de monosacárido para formar moléculas mayores. Cuando hay menos de ocho monosacáridos, se puede usar un prefijo griego que indica el número o bien el término general **oligosacárido**. La palabra **polisacárido** se refiere a un polímero con más de ocho monosacáridos. Los oligo- y polisacáridos pueden ser homólogos o mixtos.

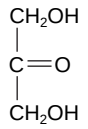
La mayor parte de los *monosacáridos* son asimétricos, consideración importante puesto que los enzimas suelen actuar sobre una sola forma isomérica. Los glúcidos más sencillos son el gliceraldehído y la dihidroxiacetona cuyas estructuras, expresadas en proyecciones de Fisher, son como sigue:



D-Gliceraldehído

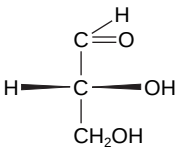


L-Gliceraldehído



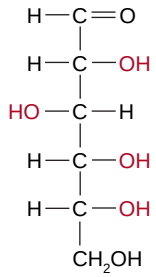
Dihidroxiacetona

El D-gliceraldehído también se puede escribir así:

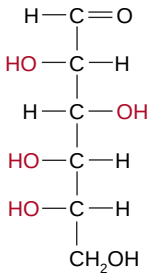


En el sistema de Cahn, Ingold y Prelog, las denominaciones son *R* (*rectus*: derecha) y *S* (*sinister*: izquierda).

La configuración de monosacáridos viene determinada por la estereoquímica del carbono asimétrico más alejado del grupo carbonilo (número 1 para un aldehído; el más bajo posible para una cetona). En base a la *posición* del —OH en el carbono asimétrico de número más elevado, un monosacárido es D si el —OH se proyecta hacia la *derecha* y L si se proyecta hacia la *izquierda*. Los monosacáridos D y L con el mismo nombre son **enantiómeros**, y en ellos los sustituyentes de todos los carbonos asimétricos están invertidos como en el caso:

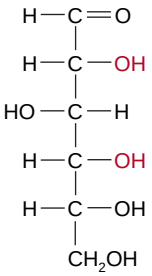


D-Glucosa

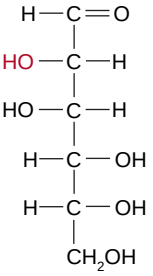


L-Glucosa

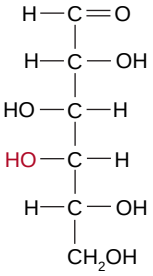
Los **epímeros** (p. ej., glucosa y manosa) son estereoisómeros que difieren en la configuración alrededor de *un solo* carbono asimétrico. La relación entre los grupos —OH determina el monosacárido específico. Tres aldohexosas y tres pentosas de importancia son:



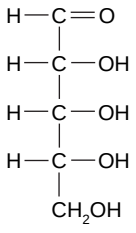
D-Glucosa



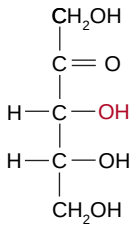
D-Manosa



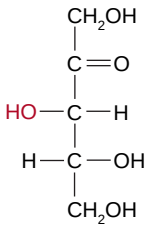
D-Galactosa



D-Ribosa

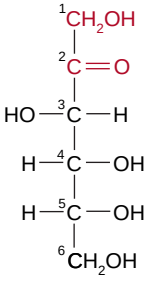


D-Ribulosa

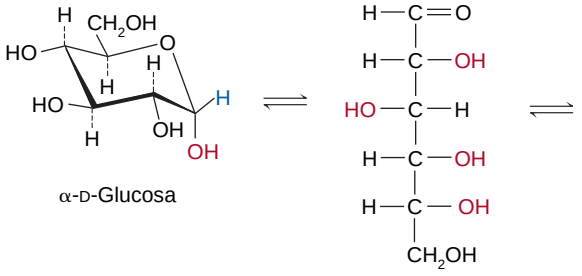


D-Xilulosa

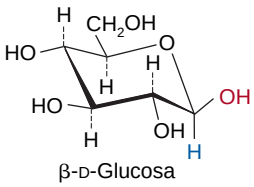
La fructosa, una cetohexosa, se diferencia de la glucosa tan sólo en los carbonos 1 y 2:



Los monosacáridos de cinco y seis carbonos forman **hemiacetales cíclicos** o **hemicetales** en solución. Se genera un nuevo carbono asimétrico de modo que son posibles dos formas isoméricas:

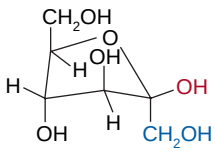


α-D-Glucosa ⇌ D-Glucosa ⇌



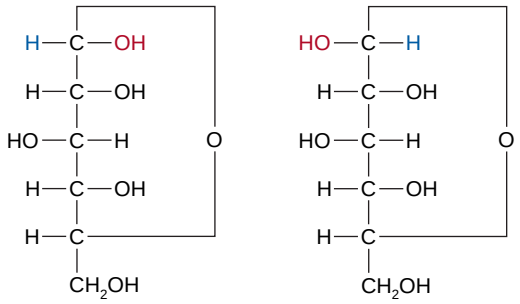
β-D-Glucosa

Son posibles tanto las estructuras en anillo de cinco (furanosa) y seis (piranosa) componentes, aunque los anillos de piranosa son más comunes. Un anillo de furanosa se escribe como sigue:



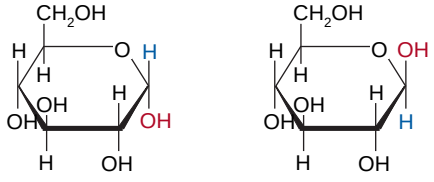
β-D-Fructosa

El isómero se denomina α- si el —OH y el —CH_2OH de los dos carbonos unidos por el oxígeno están en posición trans entre sí, y β- si están en cis. Las formas hemiacetal y hemicetal también pueden escribirse como *fórmulas de proyección de Fisher* modificadas: α si el —OH del carbono del acetal o cetal se proyecta en el mismo lado del anillo, y β si lo hace en el lado opuesto:

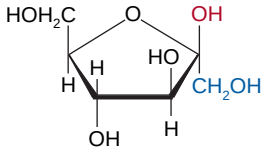


α-D-Glucosa β-D-Glucosa

Las estructuras de **Haworth** se usan con mucha frecuencia:



α-D-Glucosa β-D-Glucosa



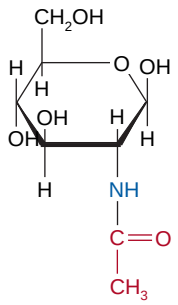
β-D-Fructosa

El anillo se encuentra perpendicular al plano del papel, con el oxígeno hacia arriba y a la derecha, el carbono 1 hacia la derecha, y los sustituyentes por encima o por debajo del plano del anillo. El —OH del carbono del acetal o del cetal se encuentra por debajo en el isómero α y por encima en el isómero β. Cualquier grupo que se escriba hacia la derecha en la proyección de Fisher se escribe hacia abajo en la estructura de Haworth.

Las formas α y β del mismo monosacárido son formas especiales de epímeros denominadas *anómeros*, que difieren tan sólo en la configuración alrededor del carbono anomérico (acetal o cetal). Los monosacáridos existen en solución en un principio como mezclas de hemiacetales (o hemicetales), pero reaccionan químicamente como aldehídos o cetonas. La **mutarrotación** es la equilibración de las formas α y β a través de los aldehídos y cetonas libres. La sustitución de H del —OH anomérico impide la mutarrotación y fija la configuración en la forma α o en la β.

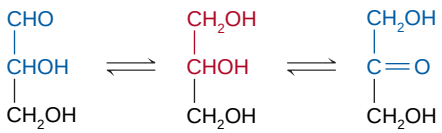
Derivados de monosacáridos

Un **desoximonosacárido** es un compuesto en el que se ha reemplazado un —OH por un —H. En los sistemas biológicos, esto ocurre en el carbono 2 a no ser que se indique lo contrario. En los **amino monosacáridos**, un —OH ha sido reemplazado por un —NH_2, siempre en el carbono 2 si no se indica lo contrario. El grupo amino de un amino azúcar puede sufrir *acetilación*:

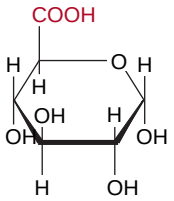


β-*N*-Acetilglucosamina

Un aldehído se reduce a un **alcohol monosacárido (alditol)** primario y una cetona a uno secundario. Los alcoholes reciben su denominación del nombre básico del azúcar más la terminación *-itol* o bien con su nombre trivial (glucitol = sorbitol). Los monosacáridos que se diferencian en tan sólo dos de los tres primeros carbonos dan lugar al mismo alditol. El D-gliceraldehído y la dihidroxiacetona dan glicerol:

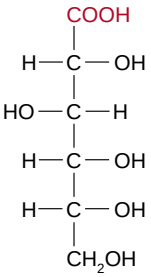


La D-glucosa y la D-fructosa dan D-sorbitol: la D-fructosa y la D-manosa dan D-manitol. La oxidación del —CH_2OH terminal, pero no del —CHO, da lugar a un **ácido urónico**, un *ácido monosacárido*:

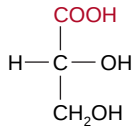


Ácido D-glucurónico

La oxidación del —CHO, pero no del —CH_2OH, da un **ácido -ónico**:

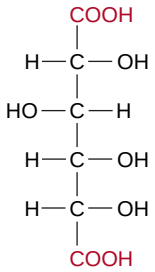


Ácido D-glucónico



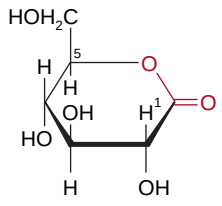
Ácido D-glicérico

La oxidación tanto del —CHO como del —CH_2OH, da lugar a un **ácido -árico**:

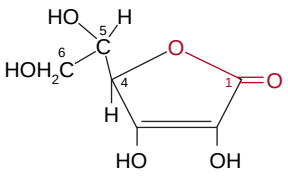


Ácido D-glucárico

Las cetonas no forman ácidos. Tanto los ácidos -ónicos como los -urónicos pueden reaccionar con un —OH de la misma molécula para formar una **lactona** (véase p. 1170):



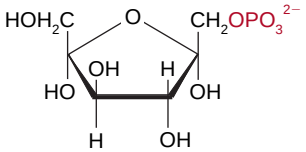
D-Glucano-5-lactona

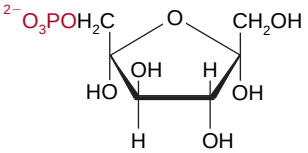


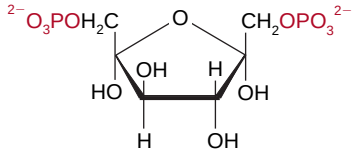
Ácido L-ascórbico
(derivado de la L-gulosa)

Reacciones de los monosacáridos

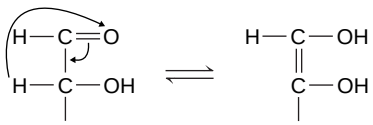
Los *ésteres* más comunes de los monosacáridos son los fosfoésteres en los carbonos 1 y/o 6.



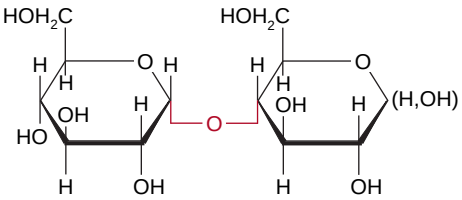




Para que un azúcar sea **reductor** debe ser posible la mutarrotación. En medio alcalino, se forman enedioles que pueden migrar a las posiciones 2,3 y 3,4:



Los enedioles pueden oxidarse por acción de O_2, Cu^{2+}, Ag^+, Hg^{2+}. La capacidad reductora es más importante en el laboratorio que fisiológicamente. Un hemiacetal o hemicetal puede reaccionar con el —OH de otro monosacárido para formar un disacárido (*acetal: glucósido*) (véase más adelante).



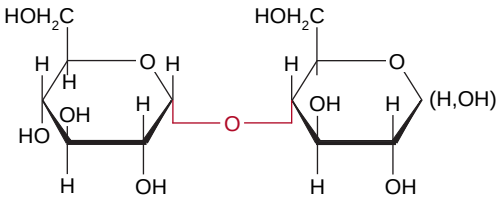
(Puede estar en α o en β)

Enlace α-1,4-glucosídico

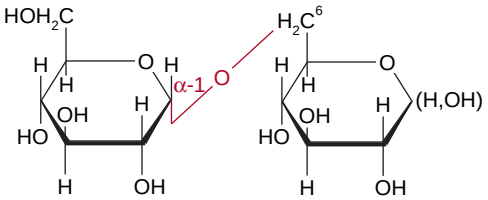
Un monosacárido posee todavía un carbono anomérico libre y puede seguir reaccionando. La reacción del —OH anomérico puede producirse con cualquier —OH de otro monosacárido, incluido el anomérico. El —OH anomérico que ha reaccionado se fija como α o como β y no puede mutarrotar o reducirse. Si el enlace glucosídico no se encuentra entre dos carbonos anoméricos, una de las unidades estará todavía en libertad de mutarrotar y reducirse.

Oligo- y polisacáridos

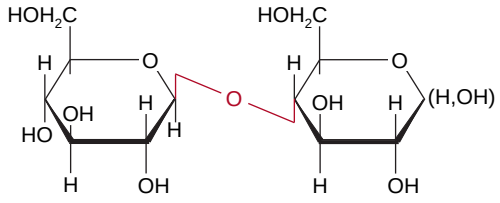
Los *disacáridos* están formados por dos monosacáridos, ya sean iguales o diferentes, con un enlace glucosídico entre ellos. Si el enlace glucosídico se da entre dos carbonos anoméricos, el disacárido es no reductor:



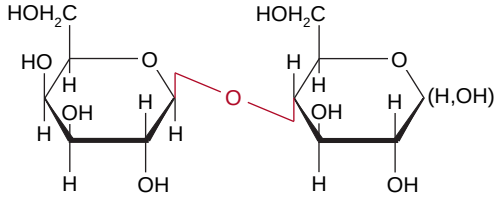
Maltosa



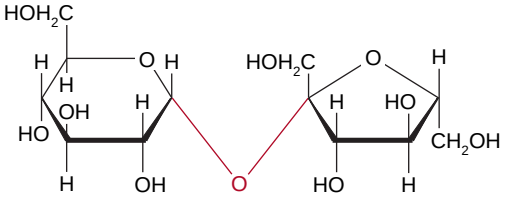
Isomaltosa



Celobiosa



Lactosa



Sacarosa

Maltosa = 4-*O*-(α-D-glucopiranosil)D-glucopiranosa; reductora

Isomaltosa = 6-*O*-(α-D-glucopiranosil)D-glucopiranosa; reductora

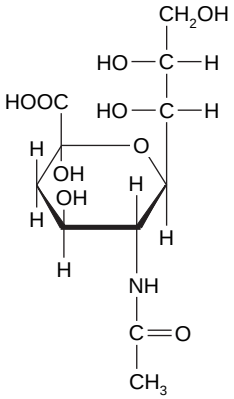
Celobiosa = 4-*O*-(β-D-glucopiranosil)D-glucopiranosa; reductora

Lactosa = 4-*O*-(β-D-galactopiranosil)D-glucopiranosa; reductora

Sacarosa = α-D-glucopiranosil-β-D-fructofuranósido; no reductora

Pueden unirse hasta miles de monosacáridos, ya sean iguales o diferentes, mediante enlaces glucosídicos, formando *polisacáridos*. Generalmente reaccionan el carbono anomérico de una de las unidades con el carbono 4 ó 6 de la siguiente. Los extremos de un polisacárido no son idénticos (extremo reductor = carbono anomérico libre; no reductor = carbono anomérico ligado a la siguiente unidad; polisacárido ramificado = más de un extremo no reductor). Los glúcidos más comunes son los homopolímeros de glucosa; entre ellos se cuentan, por ejemplo, el almidón, el glucógeno y la celulosa. El almidón de las plantas es una mezcla de **amilosa**, polímero lineal de unidades de maltosa, y **amilopectina** ramificaciones de unidades de maltosa repetidas (glucosa-glucosa con enlaces α-1-4) unidos a través de enlaces tipo isomaltosa. El **glucógeno**, la forma de almacenaje de glúcidos en animales, es similar a la amilopectina, pero las ramificaciones son más cortas y se dan con mayor frecuencia. La **celulosa**, que se halla en las paredes celulares de las plantas, es un polímero lineal de celobiosas encadenadas (glucosa-glucosa formando enlace β-1-4.)

Los *mucopolisacáridos* contienen aminoazúcares, libres y acetilados, ácidos urónicos, ésteres de sulfato y ácidos siálicos además de los monosacáridos simples. La fórmula del ácido ***N*-acetilneuramínico**, un ácido siálico, es:



LÍPIDOS

Los **lípidos** constituyen un complejo grupo de compuestos relacionados principalmente porque son insolubles en agua, solubles en disolventes no polares, y que se encuentran en tejidos animales y vegetales.

Los lípidos *saponificables* dan lugar a sales de ácidos grasos después de hidrólisis alcalina. *Acilgliceroles* = glicerol + ácido(s) graso(s); *fosfoacilgliceroles* = glicerol + ácidos grasos + HPO_4^{2-} + alcohol; *esfingolípidos* = esfingosina + ácido graso + grupo polar (fosforilalcohol o glúcido); *ceras* = alcohol de cadena larga + ácido graso. Los *lípidos insaponificables* (*terpenos, esteroides, prostaglandinas,* y compuestos relacionados) no suelen ser objeto de hidrólisis. Los lípidos *anfipáticos* poseen un grupo extremo polar ("cabeza") y otro grupo opuesto no polar ("cola"). Las moléculas anfipáticas pueden estabilizar las emulsiones y son las responsables de la estructura en bicapa lipídica de las membranas.

Los **ácidos grasos** son ácidos monocarboxílicos con cadenas alifáticas cortas (<6 carbonos), de mediana longitud (8-14 carbonos) o largas (>14 carbonos). Los biológicamente importantes son generalmente moléculas lineales con un número par de carbonos (16-20). Los ácidos grasos se numeran utilizando números arábigos (—COOH es el 1) o el alfabeto griego (—COOH no recibe ninguna denominación; los carbonos adyacentes se denominan α, β, γ, etc.). Los **ácidos grasos saturados** tienen la fórmula general $CH_3(CH_2)_nCOOH$. (*Ácido palmítico* = C_{16}; *ácido esteárico* = C_{18}.) Tienden a formar cadenas extendidas y a ser sólidos a temperatura ambiente, a no ser que la cadena sea corta. Se usan tanto nombres triviales como sistemáticos (ácido + el prefijo que indica el número de carbonos + *anoico*). $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ = ácido palmítico o ácido hexadecanoico.

Los **ácidos grasos insaturados** poseen uno o más dobles enlaces. La mayor parte de los ácidos grasos naturales poseen dobles enlaces en cis y suelen ser líquidos a temperatura ambiente. Los ácidos grasos con dobles enlaces en trans tienden a presentar puntos de fusión más altos. El doble enlace se indica por Δ^n, siendo *n* el número del primer carbono sobre el que se produce el doble enlace. *Palmitoleico* = ácido Δ^9-hexadecenoico; *oleico* = ácido Δ^9-octadecenoico; *linoleico* = ácido $\Delta^{9,12}$-octadecadienoico; *linolénico* = ácido $\Delta^{9,12,15}$-octadecatrienoico; *araquidónico* = $\Delta^{5,8,11,14}$-icosatetraenoico. Como los ácidos grasos son alargados *in vivo* a partir del extremo carboxilo, los bioquímicos utilizan una terminología alternativa para asignar estos ácidos

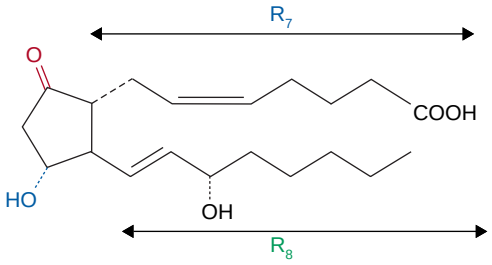
grasos a familias: omega (ω) menos x (o $n - x$), donde x es el número de átomos de carbono a partir del extremo metilo donde se encuentra el primer enlace doble. Los ácidos *palmitoleico* y *oleico* son $\omega - 9$, el *linoleico* y el *araquidónico* son $\omega - 6$, y el *linolénico* $\omega - 3$. La adición de átomos de carbono no cambia la familia a la cual pertenece un ácido graso insaturado.

Dado que los pK de los ácidos grasos están alrededor de 4-5, en soluciones fisiológicas suelen estar en forma ionizada, formando sales o "jabones". Los ácidos grasos de cadena larga son insolubles en agua, pero los jabones forman micelas. Los ácidos grasos forman ésteres con alcoholes y tioésteres con el coenzima A.

Las reacciones bioquímicamente significativas de los ácidos grasos son

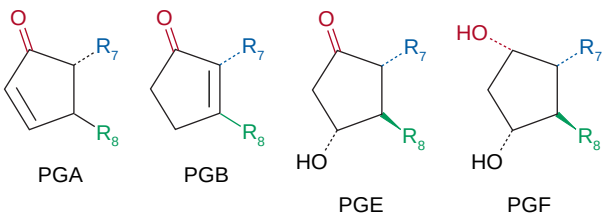
1. *Reducción* —CH═CH— + XH_2 → —CH_2CH_2— + X
2. *Adición de agua* —CH═CH— + H_2O → —CH(OH)—CH_2—
3. *Oxidación* R—CH═CH—R′ → R—CHO + R′—CHO

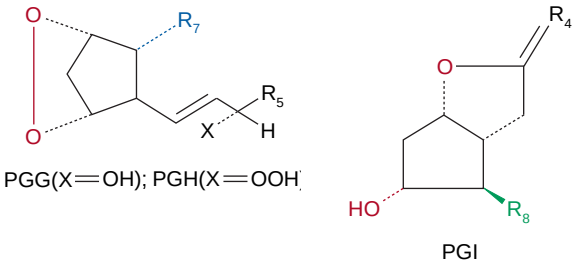
Las *prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos* son derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, especialmente de ácido araquidónico. Las **prostaglandinas** poseen la estructura general.



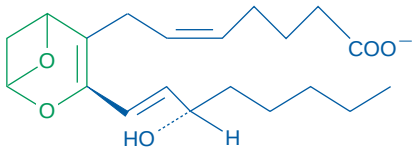
PGE_2

Las series difieren una de otra en los sustituyentes del anillo y en si el carbono 15 contiene un —OH o un —O · OH. El subíndice indica el número de dobles enlaces en las cadenas laterales. Los sustituyentes indicados por —(β) están situados por encima del plano del anillo; los indicados por ···(α), debajo:



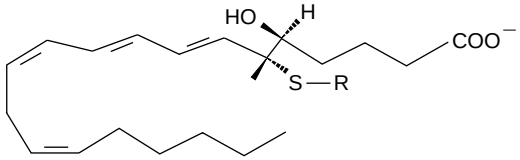


Los **tromboxanos** tienen un oxígeno incorporado formando un anillo de seis componentes:



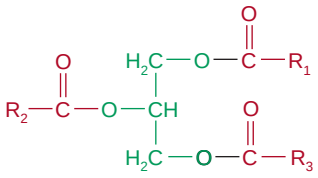
TXA_2

Los **leucotrienos** son derivados sustituidos del ácido araquidónico, en los que no se ha formado ningún anillo interno: R es variable:



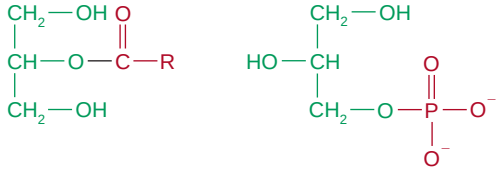
Leucotrieno C, D, o E

Los **acilgliceroles** son compuestos en los que uno o más de los tres grupos hidroxilo del glicerol se encuentra esterificado. En los **triacilgliceroles** (triglicéridos), los tres grupos hidroxilo están esterificados con ácidos grasos. Normalmente al menos dos de los tres grupos R son diferentes. Si R_1 no es igual a R_3, la molécula es asimétrica y presenta la configuración L.

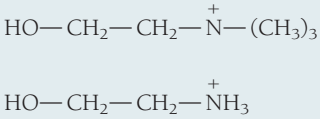
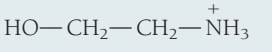
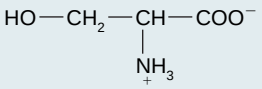
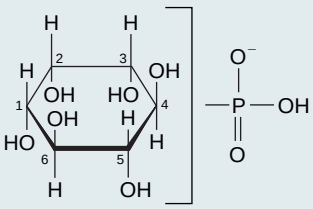


Las propiedades de los triacilgliceroles vienen determinadas por las de los ácidos grasos que contienen; se dividen en *aceites* líquidos a temperatura ambiente (preponderancia de ácidos grasos de cadena corta y/o ácidos grasos insaturados en cis) y *grasas* sólidas (preponderancia de ácidos grasos de cadena larga saturados y/o insaturados en trans).

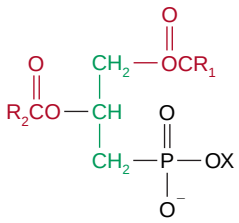
Los triacilgliceroles son hidrofóbicos y no forman micelas estables. Se pueden hidrolizar a glicerol y tres ácidos grasos mediante hidrólisis alcalina fuerte o adición de enzimas (lipasas). Los *mono-* (normalmente con el ácido graso en la posición β(2) y *diacilgliceroles* también se dan en pequeñas cantidades como intermediarios metabólicos. Los mono- y diacilgliceroles son ligeramente más polares que los triacilgliceroles. Los *fosfoacilgliceroles* son derivados del L-α-glicerolfosfato (L-glicerol-3-fosfato):



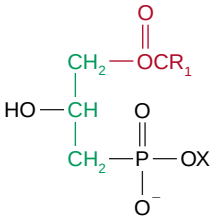
El compuesto de partida, el **ácido fosfatídico** (dos grupos —OH del L-α-glicerolfosfato esterificados con ácidos grasos), tiene su fosfato esterificado con un alcohol (X—OH) formando varias series de fosfoacilgliceroles. Estas son moléculas anfipáticas, peros su carga neta a pH 7,4 depende de la naturaleza de X—OH.

X—OH	*Fosfoacilglicerol*
	Fosfatidilcolinas (lecitinas)
	Fosfatidiletanolaminas (cefalinas)
	Fosfatidilserinas
	Fosfatidilinositoles fosfato en 4, o en 4 y 5

En el caso de los **plasmalógenos**, el —OH del carbono 1 está formando un enlace *éter*, y no éster, con un grupo alquilo. Si *uno* de los ácidos grasos (normalmente el β) sufre hidrólisis a partir de la forma fosfoacilglicerol, el compuesto es un *liso*-compuesto; por ejemplo, la lisofosfatidilcolina (lisolecitina):

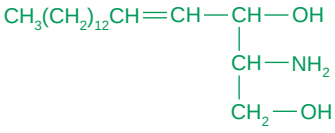


Un fosfoacilglicerol

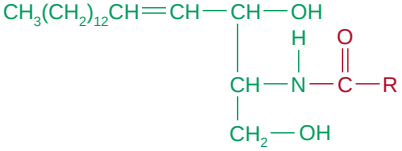


Un liso-compuesto

Los **esfingolípidos** son lípidos complejos que derivan del alcohol insaturado de 18 carbonos esfingosina. En las *ceramidas*, un ácido graso de cadena larga está unido a la esfingosina mediante un enlace amida:

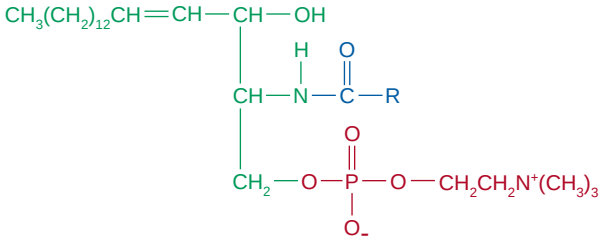


Esfingosina

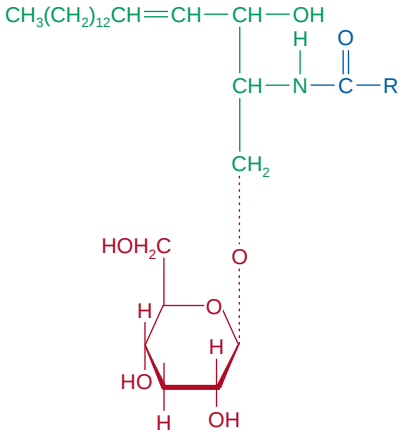


Una ceramida

Las **esfingomielinas**, los esfingolípidos más comunes, son una familia de compuestos en los que el grupo hidroxilo primario de una ceramida se encuentra esterificado con fosforilcolina (fosforiletanolamina):



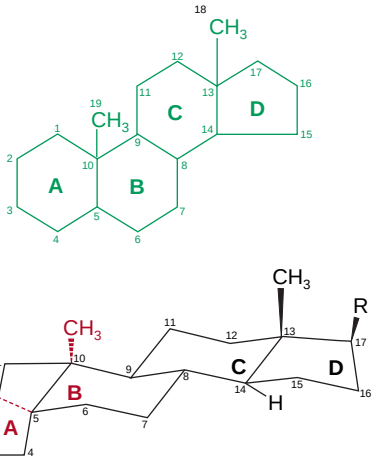
Se trata de moléculas anfipáticas, que existen como zwitteriones a pH 7,4, y son los únicos esfingolípidos que contienen fósforo. Los *glucoesfingolípidos* no contienen fósforo, pero contienen un glúcido unido por enlace glucosídico al alcohol primario de una ceramida. Son anfipáticos y de carácter neutro o ácido según si la porción glucídica contiene o no un grupo ácido. Los **cerebrósidos** contienen una sola glucosa o galactosa unida a una ceramida. Los *sulfátidos* son galactosilceramidas esterificadas con sulfato en el carbono 3 de la galactosa:



Glucosilceramida (glucocerebrósido)

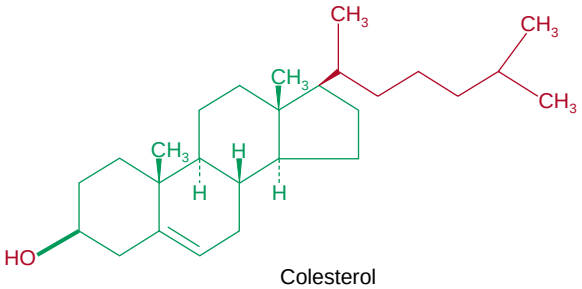
Los *globósidos (oligosacáridos de ceramida)* son ceramidas con dos o más monosacáridos neutros, mientras que los **gangliósidos** tienen un oligosacárido que contiene uno o más ácidos siálicos.

Los **esteroides** son derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno. El núcleo esteroide es bastante rígido, con una estructura esencialmente plana; los sustituyentes situados por encima del plano de los anillos se denominan β (línea continua) y los situados por debajo de dicho plano (línea discontinua) se denominan α:

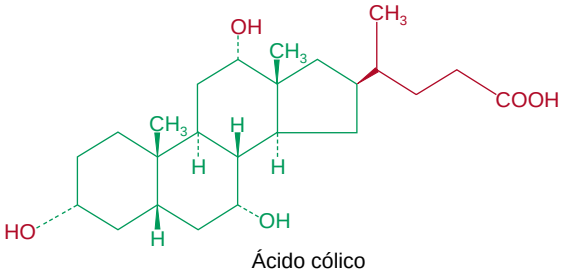


Anillos A y B, cis; el resto trans

La mayor parte de los esteroides hallados en la especie humana tiene los grupos metilo en las posiciones 10 y 13, y normalmente una cadena lateral en posición 17. Los *esteroles* contienen uno o más grupos —OH, libres o esterificados con un ácido graso. La mayoría de los esteroides son no polares. En un liposoma o en la membrana celular, el **colesterol** se orienta con el —OH hacia algún grupo polar; los ésteres de colesterol, en cambio, no. Los **ácidos biliares** (p. ej., el ácido cólico) tienen una cadena lateral polar, con lo que son anfipáticos:

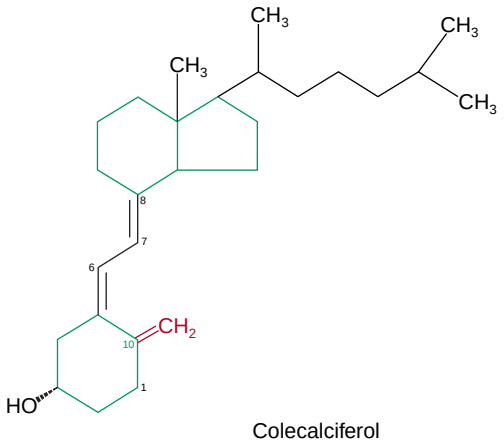


Colesterol



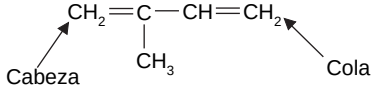
Ácido cólico

Las **hormonas esteroides** son esteroides oxigenados de 18-21 carbonos. Los *estrógenos* tienen 18 átomos de carbono, un anillo aromático A, y no llevan ningún metilo en el carbono 10. Los *andrógenos* tienen 19 carbonos, y no poseen cadena lateral en el carbono 17. Los *glucocorticoides* y *mineralocorticoides* tienen 21 átomos de carbono, incluyendo una cadena lateral oxigenada de dos carbonos en el carbono 17. La *vitamina D_3 (colecalciferol)* no es un esterol, pero en los seres humanos deriva del 7-deshidrocolesterol:

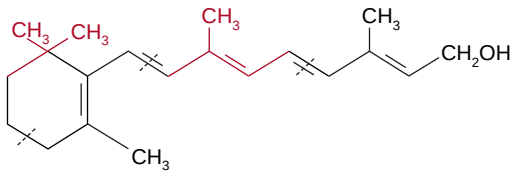


Colecalciferol

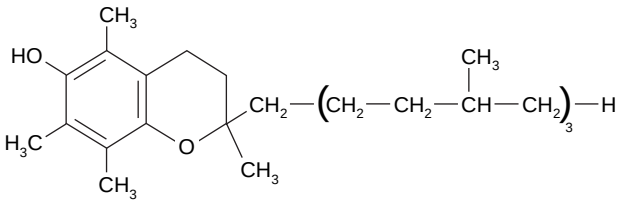
Los *terpenos* son polímeros de dos o más unidades de isopreno. El **isopreno** es



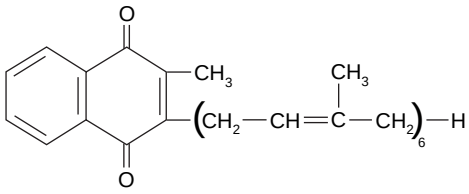
Los terpenos pueden ser lineales o cíclicos, con los isoprenos generalmente unidos cabeza con cola y la mayoría de dobles enlaces en trans (aunque pueden ser cis como en la vitamina A). El *escualeno*, precursor del colesterol, es un terpeno lineal de seis unidades de isopreno. Las *vitaminas* liposolubles (A, D, E, K) contienen unidades de isopreno:



Vitamina A



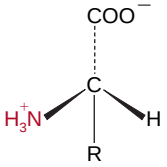
Vitamina E (α-tocoferol)



Vitamina K_2

AMINOÁCIDOS

Los **aminoácidos** contienen un grupo *amino* (—NH_2) y un grupo *ácido carboxílico* (—COOH). Los aminoácidos biológicamente importantes son generalmente ***α***-aminoácidos con la fórmula



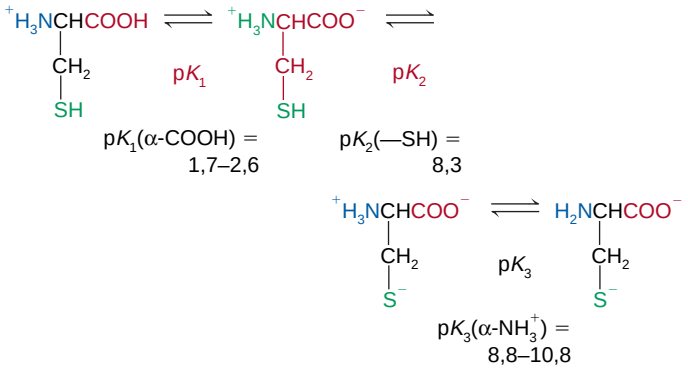
L-α-Aminoácido

El grupo amino, con un par de electrones no compartido, es básico, con un pK_a de aproximadamente 9,5 y existe principalmente en forma de —NH_3^+ a pH cercanos a la neutralidad. El grupo carboxílico (p*K* aproximado de 2,3) existe principalmente en forma de ion carboxilato. Si R es cualquier grupo diferente de —H, la molécula es asimétrica, siendo la mayoría de las naturales de la configuración L (la misma configuración relativa que el L-gliceraldehído; véase p. 1172).

La *polaridad* de los aminoácidos está influenciada por sus cadenas laterales (grupos R) (véase la p. 96 donde se encuentran las estructuras completas). Entre los aminoácidos *no polares* se incluyen aquellos que poseen una cadena lateral con grupos grandes, alifáticos, aromáticos o sulfurados sin disociar (alifáticos = Ala, Val, Leu, Ile; aromáticos = Phe, Trp; azufre = Cys, Met). Los aminoácidos de *polaridad intermedia* incluyen Gly, Pro, Ser, Thr y Tyr (no disociados).

Los aminoácidos con cadenas laterales ionizables son *polares*. Los p*K* de los grupos laterales de arginina, lisina, glutamato y aspartato hacen que estos residuos estén casi siempre cargados a pH fisiológico, mientras que los grupos laterales de las histidina (pK = 6,0) y cisteína (pK = 8,3) existen como especies tanto cargadas como no cargadas a pH 7,4 (ácidos = Glu, Asp, Cys: básicos = Lys, Arg, His). Aunque la cisteína sin disociar es apolar, la cisteína en forma disociada es polar.

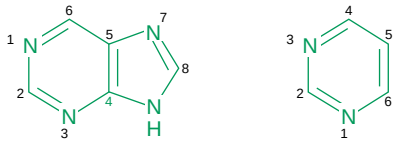
Todos los aminoácidos son como mínimo *ácidos dibásicos* por la presencia de grupos α-amino y α-carboxilo, siendo el estado iónico dependiente del pH del medio. La presencia de otro grupo ionizable dará lugar a un ácido tribásico, como se muestra para la cisteína:



La **forma zwitteriónica** es aquella en la que la carga neta es cero. El *punto isoeléctrico* es la media de los dos pK involucrados en la formación de la forma zwitteriónica. En el ejemplo anterior, sería la media de pK_1 + pK_2.

PURINAS Y PIRIMIDINAS

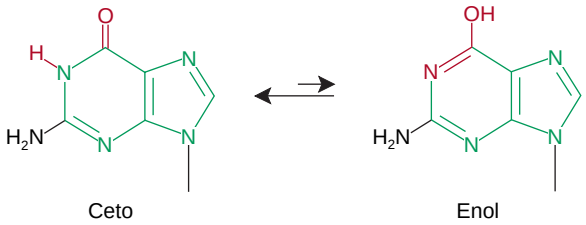
Las **purinas** y **pirimidinas**, a menudo denominadas *bases*, son compuestos heterocíclicos nitrogenados con las siguientes estructuras



Las bases principales que se encuentran en ácidos nucleicos y como nucleótidos celulares son:

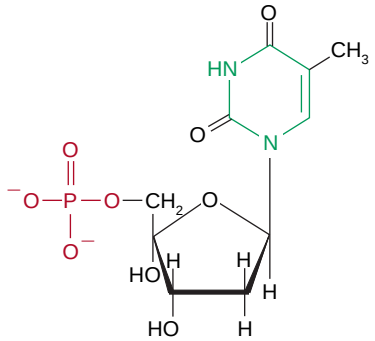
Purinas	*Pirimidinas*
Adenina: 6-amino	Citosina: 2-oxi, 4-amino
Guanina: 2-amino, 6-oxi	Uracilo: 2,4-dioxi
	Timina: 2,4-dioxi, 5-metil
Otras bases importantes, que se encuentran principalmente como intermedios de la síntesis y/o degradación, son	
Hipoxantina: 6-oxi	Ácido orótico: 2,4-dioxi, 6-carboxi
Xantina:2,6-dioxi	

Las purinas y las pirimidinas *oxigenadas* existen como estructuras *tautoméricas* en las que predomina la forma ceto, y están involucradas en la formación de enlaces de hidrógeno entre bases en los ácidos nucleicos:



Los **nucleósidos** poseen o bien un β-D-ribosa o una β-D-2-desoxirribosa con enlace *N*-glucosídico entre el carbono 1 del azúcar y el nitrógeno 9 (purinas) o nitrógeno 1 (pirimidinas).

Los **nucleótidos** tienen uno o más grupos fosfato esterificados con el azúcar. Si hay más de un fosfato presente, éstos se encuentran unidos unos a otros mediante enlaces fosfoanhídrido. Los monofosfatos se pueden denominar como el monofosfato de la base o como *ácido -ílico* (AMP: ácido adenílico):



Por reglas convencionales de *nomenclatura*, los átomos de la base se numeran 1-9 en las purinas o 1-6 en las pirimidinas, y los carbonos del azúcar 1′-5′. Un nucleótido con un nombre sin modificar indica que el azúcar es ribosa y que el(los) fosfato(s) está(n) unido(s) al carbono 5′ del azúcar. Las formas desoxi se indican mediante el prefijo d (dAMP = ácido desoxiadenílico). Si el fosfato se encuentra esterificado en cualquier otra posición diferente de 5′, debe denominarse de acuerdo con ello [3′-AMP; 3′-5′-AMP (AMP cíclico; cAMP)] Los nucleósidos y nucleótidos (forma ribosa) se denominan de la manera siguiente:

Base	*Nucleósido*	*Nucleótido*
Adenina	Adenosina	AMP, ADP, ATP
Guanina	Guanosina	GMP, GDP, GTP
Hipoxantina	Inosina	IMP
Xantina	Xantosina	XMP
Citosina	Citidina	CMP, CDP, CTP
Uracilo	Uridina	UMP, UDP, UTP
Timina	dTimidina	dTMP, dTTP
Ácido orótico	Orotidina	OMP

En los ácidos nucleicos también existen **bases minoritarias (modificadas)** y nucleósidos. Las bases *metiladas* tienen un grupo metilo sobre un grupo amino (*N*-metil guanina), sobre un átomo del anillo (1-metil adenina) o sobre un grupo hidroxilo del azúcar (2′-*O*-metil adenosina). El *dihidrouracilo* tiene el doble enlace 5-6 saturado. En la *pseudouridina*, la ribosa está unida al carbono 5 en lugar de estar unida al nitrógeno 1.

En los **polinucleótidos** (*ácidos nucleicos*), los mononucleótidos están unidos por enlaces fosfodiéster entre el hidroxilo 3′ de un azúcar (ribosa o desoxirribosa) y el hidroxilo 5′ del siguiente (veáse la estructura correspondiente en la p. 33.)

ÍNDICE

A23187 (ionóforo de calcio), 529, 529f, 529t
Abetalipoproteinemia, 128ap, 510ap, 711ap, 1110ap
ABP. Véase Proteína de fijación de andrógenos
Abrazadera
  cargadores de la, 175
  factor de carga de la, 175
Abrazaderas deslizantes, 172, 172f
Absorbancia molar, 151
Absorción de grasas, prevención de la, 1106ap
Absorción de nutrientes, 1082 – 1084, 1083f. *Véase también* Digestión; nutrientes específicos,
Abzima, 450, 450f
Acción de masas, cociente según la ley de, 614 – 616
Aceites, 1176
Aceptor de protones, 9
Acetal(es), 1170
Acetaldehído, 423ap, 611
Acetato, 898
Acetato tioquinasa, 548
Acetil CoA, 545, 547
  ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Véase Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
  como fuente de ácidos grasos, 698 – 703
  conversión del grupo acetilo a CO_2 y H_2O, 557 – 558
  destinos, 547 – 552, 548f
  en la formación de cuerpos cetónicos, 720 – 722
  en la síntesis de acetoacetato, 720
  fuentes, 547 – 552, 548f, 701 – 703
  rutas que lo utilizan, 552, 552f
  síntesis de colesterol a partir de, 742 745
    ácido mevalónico como intermediario, 742 – 743, 743f
    escualeno, 744f – 746f, 745
    farnesil pirofosfato, 744 – 745, 744f
  transporte, 701 – 703, 703f
    desde la mitocondria hasta el citosol, 701 – 703
N-Acetil-5-metoxitriptamina, 810 – 811
Acetil-CoA carboxilasa, 698, 698f, 1153
Acetilcolina, 434ap, 518, 970, 998, 1025, 1086, 1087f
  acciones como neurotransmisor, 998 – 999, 998f, 999f
  como secretagogo, 1086, 1086t
  estructura, 517f
  y respuesta al estrés, 919, 921f
Acetilcolina, receptor nicotínico de la, 516, 993
Acetilcolinesterasa, 999, 999f
N-Acetildigalactosamina, 499
N-Acetilgalactosamina, determinación del grupo sanguíneo por, 678
N-Acetilglucosamina, 499, 677 – 678, 684, 1173
N-Acetilglucosamina sulfatasa, deficiencia de, 688ap
N-Acetilglucosaminidasa, deficiencia de, 688ap
N-Acetilglutamato, 788, 788f, 789
N-Acetilglutamato sintetasa, 789
  deficiencia, 790ap
N-Acetilserotonina, 932
N-Acetiltransferasa, 932
Acetoacetato, 547, 712, 712f, 720 – 722, 721f, 798 – 799. *Véase también* Cuerpos cetónicos
Acetoacetil CoA, en la utilización de cuerpos cetónicos, 720 – 722
Acetona, 712, 720 – 722. *Véase también* Cuerpos cetónicos
Aciclovir, 857, 857f
  para las infecciones por herpesvirus, 854
Ácido(s), 9, 9 – 14, 1170. *Véase también* Equilibrio ácido-base; ácido específico
  amortiguación
  conjugado, 9
  dibásico, 1179
  general, 444 – 445
  importancia biológica, 9 – 11
  tribásico, 1179
Ácido 4-amino- N^{10}-metilfólico. *Véase* Metotrexato
Ácido aminolevulínico, síntesis, 1067f
Ácido aminolevulínico deshidratasa, 1069
Ácido araquidónico, 1175
  metabolismo, 1129ap
Ácido bongkrékico, 521 – 522, 521f
Ácido carbónico, 10 – 11
Ácido cicloglutámico, 923
Ácido *cis*-docosahexaenoico, 696f
Ácido cítrico. *Véase* Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Ácido clorhídrico, secreción, 1082, 1096, 1096f
Ácido CMP-*N*-acetilneuramínico, biosíntesis, 677f, 678 – 679
Ácido colánico, 752, 752f
Ácido cólico, 1106f, 1107f, 1111
  acidez, efectos de la conjugación sobre la, 1107t
  estructura, 1178
  transporte, en células de mamíferos, 528t
Ácido desoxicólico, 528t, 752 – 753, 752f, 1107t, 1111
Ácido desoxirribonucleico. *Véase* DNA
Ácido D-glicérico, 1174
Ácido D-glucónico, 1174
Ácido D-glucurónico, 1174
Ácido esteárico, 1175
Ácido fitánico, 636, 719ap
Ácido fólico, 1154. *Véase también* Tetrahidrofolato(s)
  como coenzima, 434 – 435
  componentes, 795f
  deficiencia, 797ap, 817, 1155 – 1156, 1155f
  estructura, 1154f
    comparación con la estructura del metotrexato, 855f
  forma (coenzima) reducida, 434 – 435
  funciones en el metabolismo monocarbonado, 1154 – 1156
  metabolismo, enfermedades, 817ap
  papel metabólico en el metabolismo monocarbonado, 1154 – 1156, 1155f
  requerimientos, 1155ap
  transporte, en células de mamíferos, 528t
  y terapia anticonvulsiva, 1148ap, 1156
Ácido fosfatídico, 495, 707, 707f, 708f, 732, 1176
  en la síntesis de triacilgliceroles, 708f
  principales alcoholes esterificados con el, en la formación de glicerofosfolípidos, 495, 496f
  síntesis, 708f, 734 – 736, 735f
  síntesis de fosfolípidos a partir de, 736 – 738, 736f – 738f
Ácido glicirretínico, 977ap
Ácido glicirrícico, 977ap
Ácido glicólico, 752, 753f
Ácido glucurónico, 674 – 675, 674f, 676f
  copolímero, 684
  UDP-, formación, 674f
  y formación de glucurónidos, 675ap
Ácido glucurónico, ruta del, 603
Ácido glutámico, semialdehído del, 792, 792f
Ácido graso sintasa, 698, 701, 705 – 706
  de mamífero, 701, 702f
Ácido homogentísico, producción, 798
Ácido icosapentaenoico, 1129ap
Ácido isovalérico, estructura, 696f
Ácido láctico, 12f, 620, 620f
Ácido L-ascórbico, 674 – 675, 1174. *Véase también* Vitamina C
  en la absorción de hierro, 1057
Ácido L-idurónico, 684 – 685
Ácido linoleico, 698, 698f, 1175
Ácido linolénico, 698, 698f, 1175
Ácido lipoico, 555
Ácido litocólico, 752 – 753, 752f, 1111 – 1112
Ácido mevalónico, síntesis de colesterol, 742 – 743, 743f
Ácido mirístico, 506f, 507
Ácido monoamino dicarboxílico, titulación, 103 – 104
Ácido monosacárido, 1174
Ácido *N*-acetilneuramínico, 499, 677 – 678, 677f, 1175
Ácido nervónico, 696, 696f
Ácido neuramínico, 760
Ácido oleico, 1175 – 1176
Ácido palmítico, 506f, 507, 698, 1175
  liberación, a partir de la síntesis de ácido graso, 701f
  síntesis, secuencia de reacciones, 700 – 701, 700f

Ácido palmitoleico, 1175, 1176
Ácido *p*-aminobenzoico, 434 – 435, 434f
Ácido pantoténico, 547, 1153
Ácido picolínico, 808
Ácido piroglutámico, 923, 923t
Ácido prostanoico, 766, 767f
Ácido quenodesoxicólico, 752, 752f, 753, 1107t, 1111
Ácido retinoico, 960, 981, 981f, 1139, 1140 – 1141
  receptores de, 979, 980f, 981
Ácido ribonucleico. *Véase* RNA
Ácido siálico, 499
Ácido taurocólico, 528t
Ácido UDP-glucurónico, 612
Ácido úrico, 839
  elevación en la gota, 834ap. *Véase también* Hiperuricemia
  producción, 837 – 840
  tratamiento del cáncer y, 840ap
Ácido valproico, 1001
Ácido β-aminoisobutírico, 846 – 847
Ácido δ-aminolevulínico sintasa, 1065, 1067, 1070 – 1071
Ácido γ-aminobutírico, 790 – 791, 993, 993f, 1001, 1001f
  derivación del, 1001
  GM_1, 683ap
  receptor, 993, 993 – 994, 994f
  síntesis, 791f
  transporte, en células de mamíferos, 528t
Ácido γ-carboxiglutámico, 382, 382f, 1146 – 1147
Ácidos biliares, 1105, 1178
  acción detergente, 1104, 1105
  circulación enterohepática de, 1111, 1111f, 1112, 1112f
  colesterol como precursor, 742
  conjugados, 1111
  excreción de colesterol como, 752 – 753, 752f, 753f
  glicoconjugados, 1107, 1107t, 1111
  metabolismo, 1110 – 1112, 1110f
  micelas, 1105, 1107 – 1108
  no conjugados, 1107t, 1111
  primarios, 1110 – 1111
  secundarios, 1111
  sistema de transporte de, mecanismos moleculares, 1112, 1112f
  solubilidad en disoluciones acuosas, 1105, 1107f
  tauroconjugados, 1107, 1107t, 1111
Ácidos carboxílicos, 1170
Ácidos cisteicos, formación, por oxidación de enlaces disulfuro, 147f
Ácidos de Lewis, 428 – 430
Ácidos dicarboxílicos, 719
  transporte, en células de mamíferos, 528t
Ácidos grasos, 694, 1175
  abreviatura para los, 696t
  activación por conversión a Acil CoA graso, 713
  adición de agua, 1176
  alargamiento y desaturación, ejemplos específicos, 705
  almacenamiento de, 706 – 709
  cadena lineal, β-oxidación, 713 – 716
  catabolismo, 636f
  de cadena corta, 1175 – 1176
  de cadena larga, 495f, 497f, 498, 1108 – 1110, 1175 – 1176
    estructura, 696f
  de cadena media, 1108 – 1110
  de cadena ramificada, 705 – 706
  desaturación, posiciones para la, 704f
  dieta y, 697 – 698
  disponibilidad para los tejidos, 712
  distribución asimétrica en los fosfolípidos, 738 – 740, 739f, 740f
  en el metabolismo humano, 695f, 696t
  en fosfatidiletanolamina, 496
  en glicerofosfolípidos, 496, 497, 497t
  en la fosfatidilcolina, 497
  esenciales, deficiencias, 1126 – 1127
  fuentes, 697 – 698
  funciones en el cuerpo, 694 – 695
  gluconeogénesis a partir de, 636 – 637
  hidroxi, formación, 705
  hidroxilación, 717, 719
  insaturado, 1175 – 1176
  libres
    en la digestión de triacilgliceroles, 1105, 1107
    en la obesidad, 1124
  metabolismo, 694, 716 – 720
  métodos de transporte entre órganos, 710 – 712
  naturaleza química, 695 – 697
  nomenclatura, 696
  omega, 1129ap, 1176
  oxidación, 640, 714f, 716 – 720, 722 – 723, 723f, 868, 1176
  patrones, 708
  poliinsaturado, 704, 1128
    formación y modificación, 704 – 705
    linoleico, 1129ap
    linolénico, 1129ap
    omega-3, efectos fisiológicos, 1129ap
    omega-6, efectos fisiológicos, 1129ap
    y riesgo de enfermedad cardíaca, 1128, 1129ap
  precursores de palmitato, 703 – 705
  reacciones de alargamiento, 703 – 705
    alargamiento mitocondrial, 704f
  reducción, 1176
  rendimiento energético de la β-oxidación, 716
  saturados, 1128, 1175
    y riesgo de enfermedad cardíaca, 1128, 1129ap
  síntesis, 603
    biosíntesis de palmitato, 699t
    estequiometría, 701
    liberación de ácido palmítico, 701f
    paso comprometido, 698 – 700
    regulación, 699t
  transferencia a través de la membrana mitocondrial, 714f
  triacilgliceroles, 696 – 697, 708f
  unidos a la albúmina sérica, 711
  utilización para la producción de energía, 713 – 716
  α-oxidación, 717 – 720, 719 – 720
  β-oxidación, 716 – 720
    comparación con la biosíntesis de palmitato, 716
    modificación, 716 – 720
    palmitato, 717t
    trastornos genéticos en la, 716ap
Ácidos grasos esenciales, deficiencias, 1126 – 1127
Ácidos grasos intestinales, unión a proteína, 1108
Ácidos grasos libres
  en la digestión de triacilgliceroles, 1105, 1107
  en la obesidad, 1124
Ácidos hidroxi-icosatetraenoicos
Ácidos icosatetraenoicos, efectos fisiológicos, 774
Ácidos monoamino dicarboxílicos, 97
Ácidos monocarboxílicos, 528t
Ácidos monocarboxílicos dibásicos, 97
Ácidos monoenoicos, formación, 704
Ácidos monohidroperoxi-icosatetraenoicos
  procedencia, 772 – 773, 772f, 773f
  procesos fisiológicos que afectan, 773 – 774
Ácidos nucleicos, 28, 29, 1179
  antisentido, 318, 318 – 319
  bases, 29. *Véase también* Purina(s); Pirimidina(s)
  como sondas para secuencias específicas de DNA o RNA, 295 – 296, 296f
  detección, 296 – 298
  enzimas hidrolizantes de, 20t
  estructura polinucleotídica, 33 – 36, 33f, 34f
  identificación, 296 – 298
  unidades monoméricas, 826
Ácidos poliinsaturados, 697
Ácidos ramificados, 696
Ácidos siálicos, 677 – 678, 760, 760f. *Véase también* Ácido *N*-acetilneuramínico
Ácidos tricarboxílicos. *Véase* Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Ácidos y bases conjugados, 9 – 12, 107
Acidosis, 13ap, 712, 896
  metabólica, 721ap, 813ap
    concentración de bicarbonato en sangre, 13ap
Acidosis láctica, 620, 621ap
Aciduria orótica, 454ap, 826
Aciduria orótica hereditaria, 842ap
Acil CoA grasos
  como fuente de triacilgliceroles, 707 – 708
  reducción a alcoholes grasos, 706
Acil-CoA deshidrogenasas, 569f, 570, 715
  deficiencia, 716ap
Acilgliceroles, 695 – 697, 697f, 1175, 1176
Aconitasa, 554, 554 – 555, 1059, 1060
Acridinas, 193
ACTH. *Véase* hormona adrenocorticotrópica
Actina, 1021, 1021t, 1022ap, 1022f, 1023
  fibrosa. *Véase* Actina F
  globular. *Véase* Actina G
Actina F, 1021
  factor β, 219, 220f
  polímero de, 1023
Actina G, 1021, 1022f, 1023
  complejo ATP-Mg^{2+}, 1023
Actinina α, 1023
Actinina β, 1023
Activación metabólica, 192
Activador tisular del plasminógeno, 1045
Actividad exonucleolítica, 164, 164 – 165, 165f
Actividad quinasa del receptor de insulina, 946ap
ADA. *Véase* Adenosina desaminasa
ADA-polietilenglicol (ADA-PEG), 839ap
Adenilato ciclasa, 623, 654, 658, 658f, 925, 925f, 926f, 1086
Adenilato quinasa, 619, 1028
Adenilil ciclasa. *Véase* Adenilato ciclasa
Adenina, 29, 29f, 828
Adenina nucleótidos, 828f
Adenina translocasa, nucleótido de, 583, 583 – 584, 583f
S-Adenosilhomocisteína, 803
Adenosilhomocisteinasa, 803, 804f
S-Adenosilmetionina, 803, 871, 1154
  en reacciones de metiltransferasa, 805 – 806, 806f
  síntesis, 803f
  síntesis de cisteína a partir de, 804f
S-Adenosilmetionina descarboxilasa, 794
Adenosilsuccinato sintetasa, 833
Adenosina, 30, 30f, 426, 826, 828f

Adenosina desaminasa, 838, 839ap
  terapia génica, 320ap
  deficiencia, 839
Adenosina monofosfato. *Véase* AMP
Adenosina monofosfato cíclico. *Véase* cAMP
Adenosina trifosfato. *Véase* ATP
ADH. *Véase* Vasopresina
AdoCys. *Véase S*-Adenosilhomocisteína
Adolescentes, consideraciones nutricionales para los, 1164
AdoMet. *Véase S*-Adenosilmetionina
Adrenalina, 624 869, 919, 1000, 1000f
  acciones, 653, 658 – 659, 919, 948t
  en la glucólisis cardíaca, 626 – 628
  en la glucólisis hepática, 625f, 626
  formación, 799 – 801
  productos de excreción urinaria, 802f
  secreción, 919, 921f
  síntesis, 919, 920f, 921f
α-Adrenérgicos, receptores, 658
β-Adrenérgicos, receptores, 626, 658, 940 – 941, 940f, 941f
Afinidad, constante de (K_a), 422
Aflatoxina, 195
Agallas vegetales, plásmidos de, 320
Agentes tumorígenos, 654
Agmatina, 791, 791f
Agonista, 516
Agrecán, 688
Agregación plaquetaria, 487
  prostaglandinas y, 770
Agregado simétrico cola-cola, 1019
Agricultura, DNA recombinante en, 319 – 321
Agua, 6, 6f
  como electrolito débil, 8
  difusión, a través de membranas, 512
  en el medio celular, 6 – 14
  moléculas, 6 – 7, 6f
  propiedades como disolvente, 7
  reacciones con lactato sódico, 7f
Ah, receptor, 980
Ahorro de proteína, 1122
Ahuecamiento del azúcar, 32, 32f
Akt/NF-κB, cascada anti-apoptótica, 953
ALA. *Véase* Ácido aminolevulínico
Alameticina, 529t
β-Alanilhistidina. *Véase* Carnosina
β-Alanilmetilhistidina. *Véase* Anserina
Alanina, 95, 416f
  ciclo de la, 629 – 631, 630f, 866
β-Alanina, absorción, 1099
Albinismo, 801ap, 802
Albúmina sérica
  en el transporte de ácido graso, 711
  en el transporte de bilirrubina, 1071 – 1074
  en el transporte de triacilglicerol, 711
  unión de hormonas esteroides a la, 973 – 974
Albúmina sérica humana, curva de titulación, 105f
Alcalosis, 897
  metabolismo y, 1092ap
Alcalosis metabólica, 1092ap
Alcaptonuria, 801ap
Alcohol (etanol)
  catabolismo, 895 – 896
  contenido energético de (kcal), 1118
  efectos sobre el hígado, 895 – 896
  ingestión, y gluconeogénesis, 641 – 642, 643ap
  interacciones fármaco-nutrientes, 1165t
  oxidación, 611
  y barbitúricos, 612ap
  y fluidez de las membranas, 510ap
Alcohol deshidrogenasa, 416, 439, 611, 895 – 896
  isoenzimas, con diferentes pH óptimos, 452ap
  oxidación del etanol por, 416f, 427, 427f
Alcohol monosacárido, 1173
Alcohol(es), 479, 1170, 1173
  citosólico, 720
  graso, síntesis de plasmalógeno, 740, 740f
  primario, 1170
  secundario, 1170
  terciario, 1170
Alcoholes grasos, 706, 707f
  reducción desde acil CoA grasos, 706
Alcoholismo
  consideraciones nutricionales en el, 1150ap
  deficiencia de niacina en el, 1151
  deficiencia de riboflavina en el, 1150 – 1151
  deficiencia de zinc en el, 1162
  síndrome de Wernicke-Korsakoff en el, 1149 – 1150, 1150ap
Aldehído(s), 1170
Aldehído deshidrogenasa, 423, 423ap, 611, 720, 895 – 896
Alditol, 1173
Aldohexosas, 1172
Aldolasa, reacciones catalizadas por, 604f, 605
Aldosa deshidrogenasa, 1005
Aldosa reductasa, 1005
  y diabetes, 889ap
Aldosa-cetosa, isomerización, 671 – 673
Aldosterona, 472, 960, 963
  colesterol como precursor, 742
  como hormona de estrés, 970 – 971
  estructura, 961t
  funciones, 961t
  receptores de, 960
  rutas de excreción, 968t
  secreción, 961t, 967, 969t, 970f
  síntesis, 473, 964, 967, 969t, 970 – 971
Alergia. *Véase* Hipersensibilidad
Alimentos, pirámide del USDA, 1131, 1132f
Al-lisina, 125, 125f, 126f
Almacenamiento de grasa, 651
Almidón, 600, 1100 – 1102, 1102f
Alolactosa, 336
Alopurinol, para la gota, 854
Alosterismo
  y actividad enzimática, 436 – 440
  y cooperatividad, 439 – 441
Alteraciones coincidentes en células, 850
Alzheimer, enfermedad de, 257ap
Amanita phalloides, 210
α-Amanitina
Amidas, 1170
α-Amilasa, 644, 1101, 1102f
Amilasa pancreática, 1100
Amilopectina, 1100, 1175
  digestión por α-amilasa, 1102f
  estructura, 1101t
  fuentes, 1101t
Amilórido, 1091, 1091f, 1094
α-Amilosa, 651, 1100, 1101t, 1175
Amilo-α-1,6-glucosidasa, 648 – 649
Aminas, 1170
  primarias, 1170
  secundarias, 1170
  terciarias, 1170
Aminas biogénicas, 919, 1086
α-Amino adípico sintasa, semialdehído, 816ap
Amino monosacárido, 1173
D-Aminoácido oxidasa, 415f, 416, 416f, 440, 786
L-Aminoácido oxidasa, 786, 786f
Aminoácidos(s), 1119, 1178, 1178 – 1179
  aminoacilación del tRNA, 239 – 242
  abreviaturas, 97t
  absorción, 1099 – 1100
  activación, 82
  aromático, 95 – 96, 893 – 894
  básico, 101
  cadena ramificada, 787, 811 – 812, 812f
    metabolismo, enfermedades, 813ap
  cadenas laterales, 95 – 97, 106, 108, 108f
  centro asimétrico, 98
  cetogénicos, 634 – 636, 636t, 1119
  común, 95, 95f
  configuración absoluta, 98f
  degradación, 790 – 820
  derivado, 95, 100
  diamino, dicarboxílico, 96f
  en la gluconeogénesis, 866 – 869
  esenciales, 781, 781t, 1120 – 1121
    requerimientos de, 1120 – 1121
  estructura, 95 – 97, 96f
  forma iónica, 102
  formas ácidas, 100 – 101, 101t
  formas básicas, 100 – 101, 101t
  glucogénicos, 634 – 636, 636t, 1119
  grupos ionizables y función biológica, 101 – 109
  homología de secuencia en familias de serina proteasas, 384 – 385
  incorporación del nitrógeno en los, 781 – 786
  libres, transporte mediado por transportador, 1099 – 1100
  metabolismo, 779 – 820
    deficiencia enzimática, 799ap
    por el hígado, 893 – 894
    visión general, 780 – 781, 781f
    y cuerpos cetónicos, 722f
  modificación tras incorporación a proteínas, 266 – 268, 267t, 268f
  monoamino, dicarboxílico, 96f
  monoamino, monocarboxílico, 96f
  no polar, 106, 108, 1178
  polar, 106, 108, 1178
  polaridad intermedia, 1178
  polimerización, 98 – 100
  química, 101 – 109, 108, 109t
  residuo, 99, 99f
  separación de las proteínas según valores de pI, 105 – 106
  síntesis, 790 – 820
  sulfurados, 805ap
    enfermedades de los, 805ap
  translocación de grupo, 526 – 527
  transporte a través de membrana, 525
  transporte, 528t, 819
  transporte entre órganos, 787, 787f
  transporte epitelial, 1099, 1100ap
  utilización en el estado de buena nutrición, 864f
  β-aminoácidos, 846 – 848
Aminoaciduria, 146ap
Aminoaciduria neutral, 1100ap
Aminoacilación, tRNA, 239 – 242
  especificidad y fidelidad de las reacciones, 240 – 242, 242f
Aminoacil-tRNA, 865
Aminoazúcares, formación, 675 – 677
Aminopeptidasa(s), 1097, 1099
Aminopeptidasa A, 1085t
Aminopeptidasa N, 1085t
Aminotransferasas, 417, 417f, 782, 782f, 783 – 784, 809f
Amital, 575
Amoníaco
  acumulación
    en enfermedades hepáticas, 893 – 894
    trastornos metabólicos causados por, 789 – 790, 790ap

eliminación, 788
incorporación, 784 – 785
producción, 784, 787
Amortiguación, 12, 12 – 14, 13ap, 13f
bicarbonato en la acidosis metabólica, 13ap
capacidad amortiguadora, 12
problemas con la, 13f
AMP, 618 – 620, 619, 827, 832f, 833
AMP cíclico. *Véase* cAMP
5′-AMP aminohidrolasa, 836
AMP desaminasa, 836, 838
Amplificación, mecanismo de, en la regulación de la glucógeno fosforilasa, 654
Anabolismo, 538
Analbuminemia, 711ap
Análisis de Scatchard, 937, 938f
Análogos del estado de transición, 444, 444f
Anclas de glucosil-fosfatidilinositol, 507, 507f, 507t, 733 – 734, 734f
Andrógeno(s), 960, 963, 1178
proteína de fijación de, 974
Androstano, receptor constitutivo de, 483
Androstenodiona, 472
Anemia
deficiencia de hierro, 1062ap, 1161 – 1162
en la deficiencia de vitamina A, 1141
falciforme, 112ap
hemolítica, 451ap, 628ap, 666, 668ap, 1063
inducida por fármacos, 666, 668ap
macrocítico, 1155f
megaloblástica, 797ap, 1157
microcítica hipocrómica, 1161
perniciosa, 1156
por deficiencia de hierro, 1062ap, 1161 – 1162
sideroblástica, 1151
ligada al cromosoma X, 1057ap
Anestesia, y fluidez de las membranas 511
Anexina-I, 978
ANF. *Véase* Factor atrionatriurético
Angina de pecho, 621, 622ap
Angiotensina, receptor de, 967, 970f
Angiotensina II, 910t, 967
acciones, 914t, 948t
orígenes, 914t
Angiotensina III, 914t, 948t, 967
Angiotensinógeno, 967
Ángulos de fase, 149
Anhídridos ácidos, 1170, 1170
Anhídridos de ácidos fosfóricos y carboxílicos, 544t
Anillo de furanosa, 1173
Anillo de purina, fuente de carbono y nitrógeno en el, 832f
Anillos de piranosa, 1173
Animales transgénicos, 321 – 323, 321f, 322ap, 322f
Anión superóxido, 488, 590
Anión(es), 7, 16
Aniones orgánicos, transporte, en células de mamíferos, 528t
Anomalías endocrinas y cáncer, 893ap
Anómeros, 1171, 1173
Anquirina, 507 – 508
Anserina, 817, 818f, 1099
Antagonistas en el receptor H_2, análogos de la histamina, 1086
Antibiótico(s)
absorción, 1100
antitumorales que cambian la forma del DNA, 49ap
estructura, 857f
inhibición de la síntesis de proteínas, 254 – 255, 254t, 255f
inhibición de RNA polimerasas, 210, 211ap
para destruir bacterias productoras de, 790
sordera inducida por, 254ap
y anemia hemolítica, 668ap
y deficiencia de vitamina K, 1147
resistencia. *Véase* Resistencia a antibióticos
Antibióticos ionóforos, 529 – 530
Antibióticos β-lactámicos, absorción, 1100
Anticancerígenos
telomerasa como diana, 56ap
topoisomerasas, 65ap
y ciclo celular, 180ap
Anticoagulación, fase de la coagulación sanguínea, 1031, 1041 – 1045
inactivación de FVa y FVIIIa, 1043 – 1045, 1044f
inhibición de la ruta extrínseca, 41 – 42, 42f, 43f
Anticoagulantes, fármacos, 685ap
Anticodones, interacción con codones, 236 – 239, 236f, 237t
Anticonvertina, 1041, 1044f
Anticonvulsivos
interacciones fármaco nutrientes, 1165t
y necesidades de vitaminas, 1148ap, 1156
Anticuerpo con actividad catalítica, 450f
Anticuerpos. *Véase* Inmunoglobulina(s)
Anticuerpos Rh, 1074ap
Antidiurética, hormona. *Véase* Vasopresina
Antifolatos, 855 – 856
Antígeno nuclear de células en proliferación, 175
Antígenos, 368
Antiinflamatorios
inhibición de la producción de prostaglandina, 769 – 770, 770f
no esteroides, inhibición de la producción de prostaglandina, 769 – 770, 770f
Antimetabolitos, 434, 435 – 436, 436f, 854 – 855
Antimicina δ, 575
Antimicrobianos. *Véase también* Antibiótico(s)
topoisomerasas, 65ap
Antioxidantes, 1140, 1146, 1158
Antipalúdicos, y anemia hemolítica, 668
Antipiréticos y anemia hemolítica, 668ap
Antiport, 515, 515f, 528t, 529t
aspartato-glutamato, 632
para el transporte aniónico, 520 – 521, 520f
Antiporter, Ca^{2+}, Na^{+}, 528t
Antitrombina III, 1041, 1041 – 1042, 1043f
Antivirales, estructura, 857f
Antranilato sintetasa, 338
AP, sitio. *Véase* Sitio apurínico-apirimidínico
AP endonucleasas, 194
AP liasas, 194
Apareamiento antiparalelo, 236, 236f
Apilamiento de bases, 34, 34 – 35, 34f
Apoenzima, 414
Apoferritina, 1056, 1060, 1060f
Apolipoproteínas, 127, 129t
B, 1108, 1110ap
estructura, 131f
intestinales, 1108
Apoproteína, 395
síntesis, 749
Apoptosis, 23, 23ap, 273, 273 – 274, 786, 985
en el ciclo del ovario, 985ap
y hormonas esteroides, 985 – 986
Aptámeros, 88, 88 – 89, 88f
Apurínico-apirimidínico, sitio, 119
araC. *Véase* Citosina arabinósido
Área de superficie corporal y consumo de energía, 1118
Arginasa, 788
deficiencia, 791ap
Arginina, 97, 97f
en niños, 782
grupo guanidinio, 97f
grupo imidazolio, 97f
síntesis, 789, 791, 871f
Arginina vasopresina. *Véase* Vasopresina
Argininosuccinato, 788
Argininosuccinato liasa, 788
deficiencia, 791ap
Argininosuccinato sintetasa, 788
deficiencia, 791ap
Aromatasa, 474
Aromáticos, aminoácidos, 95, 96f, 893 – 894
Aromatización, 474
Arrestina, 1013
β″Arrestina, 941
ARS (Secuencia de replicación autónoma), 177
Arsenato
en la inhibición de la glucólisis, 613, 613f
síntesis de ATP y, 613 – 614, 613f
toxicidad, 614ap
Arsénico, envenenamiento por, 614ap
Artritis, 432ap
Asiáticos, sensibilidad al alcohol, 423ap
Asignación dietética recomendada, 1139
Asociación, constante de (K_a), 422, 937
Asparagina, 97, 680 – 681, 682f, 785 – 786, 786f
Asparagina sintetasa, tumores deficientes en, tratamiento, 786
Asparaginasa, 458, 786, 786f
Aspartamo, 882
Aspartato, 97, 788
cadenas laterales, 97f
Aspartato proteasas, 378
Aspartato-glutamato, sistema de cotransporte antiparalelo, 632
4-L-Aspartilglucosamina amidohidrolasa, deficiencia de, 683ap
Aspartilglucosilaminuria, 683ap
Aspirina, efectos sobre los niveles séricos de vitamina C, 1158
Astrocitos, 991
AT3. *Véase* Antitrombina III
Ataxia, 1149
cerebélica, 719ap
en la deficiencia de tiamina, 1149
Ataxia de Friedreich, 1057ap
Ataxia telangiectasia (A-T), gen, 45ap
Aterogénesis, 805ap
Aterosclerosis, 127, 127ap, 752ap, 805ap
Átomo aceptor, 137
Átomo dador, 137
Átomo de carbono, 1171, 1172
Átomo de carbono alfa (α), 95, 373f
ATP, 426, 539, 618, 619
ciclo, en el ciclo ayuno-alimentación, 862, 862f
como cosustrato, 426
como efector alostérico, 426
contracción muscular y, 1027 – 1030, 1028f – 1039f
en el metabolismo glucídico, 612
en el transporte facilitado activo, 522, 522f
fuente, 19, 890
para la córnea, 1003
fuente para la retina, 1005 – 1006
gasto de, gluconeogénesis y, 638 – 639
glucólisis anaeróbica y, 609
hidrólisis, contracción muscular y, 1027 – 1028
papel del, 826
potencial eléctrico transmembrana, 991, 992f, 993

regulación de la 6-fosfofructo-1-quinasa por, 618 – 620
síntesis
acoplamiento con el transporte electrónico, 577 – 579, 578f
inhibición por arseniato, 613 – 614, 613f
sobre la superficie de F_1, 580 – 581, 581f
sistemas que producen y sistemas que utilizan energía conectados por, 538 – 539, 539f
y ciclo de los ácidos tricarboxílicos. *Véase* Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
ATP sintasa, 567, 579, 579 – 582, 579f, 580f, 580t
estudios estructurales, 581 – 582, 582f
ATP:citrato liasa, 585, 702
ATP-ADP, transporte en células de mamíferos, 528t
ATP-ADP translocasa, 521 – 522, 521f
ATPasa, 522, 1019
Ca_2^+-, 523 – 524, 528t
H^+, K^+-, 1095, 1096f
Mg^{2+}, 429, 430f
Na^+, K^+-, 522 – 523, 522f, 528t, 1090 – 1091
contraluminal, en la secreción de NaCl, 1092 – 1094, 1093f
hidrólisis de ATP, 523f
inhibición, 523
ATPasa dependiente de DNA, 190
Atractilósido, 521 – 522, 521f
Atriopeptina. *Véase* Factor atrionatriurético
sistema hormonal, 952f
Atropina, 1086, 1087f
AUG, secuencia, 235, 235 – 236
Autismo, nucleótidos purínicos y, 840ap
Autoactivación, 1096 – 1097
Autofagia, 20, 21f
Autofosforilación, 944
Autoinmunidad en las enfermedades del tejido conjuntivo, 225ap
Autólisis, 384
Autorregulación, de receptores esteroides, 983
Autotirosina quinasa, 944 – 945
Axones, 991, 991f
Ayuno, estado, 866 – 869, 867f. *Véase también* Inanición
temprano, 865 – 866, 866f
Azaserina, 856
Azatiopurina, como inmunosupresor, 854
Azida, 575
39-Azido-39-desoxitimidina. *Véase* Azidotimidina
Azidotimidina (AZT), 184ap, 857
estructura, 857f
Azúcar(es)
ahuecamiento, 32, 32f
interconversiones, 671 – 678, 672f
reductor, 1174
simple. *Véase* Monosacárido(s)
sistema de reordenamiento de, 668, 669f
translocación de grupo, en bacterias, 527 – 528
transporte, en células de mamíferos, 528t
unidos a nucleósido difosfato, 673
unidos a nucleótidos
en transformaciones de azúcares, 673
formación, 671 – 678, 672f
funciones, 666
Bacillus megaterium,
citocromo P450, 486
modelo del sitio activo de P450, 467f
Bacterias
cromosomas artificiales, 307
enzimas, en la digestión de glúcidos, 1102
expresión de genes foráneos en, para la síntesis de proteínas que codifican, 309 – 310, 310f
metabolismo, 784
que contienen ureasa, 788
transcripción en, 330 – 332
transformación, con DNA recombinante, 290
transformada
detección, complementación-α para la, 295 – 296, 295f
selección, por pérdida de resistencia a antibióticos, 293 – 296, 294f
técnicas de selección, 290 – 291
vector de expresión, 309, 310f
Bacteriófagos
como vectores de clonación, 304, 306f
en mutagénesis dirigida de un único nucleótido, 315 – 317, 316f, 316f
genoteca de, 305 – 306, 306f
Bacteriófago ØX174, 73, 74f
Bacteriófago λ, 305, 306f
genoteca fago λ, 305
Balanceo, hipótesis del, 236, 236 – 237, 237t
Banco de sitios de restricción, 289
Banda 3, 520 – 521
Banda A, 1018
Banda anisotrópica, 1018
Banda H, 1018
Banda I, 1018
Banda isotrópica, 1018
Barbitúricos y alcohol, 612ap
Barorreceptor, 946
Barrera hematoencefálica, 991
Base(es), 9, 9 – 14
ácidos nucleicos, 29. *Véase también* Purina(s); Pirimidina(s)
conjugada, 9
de Schiff, 783 – 784, 783f
formas tautoméricas, 37, 37 – 38, 37f
metilado, 1179
minoritarias (modificadas), 1179
nomenclatura para las, 1179
pares ácido-base
polinucleótidos, secuencia, 34, 34f
tripletes. *Véase* Tripletes de bases
Bastones, 1007, 1007 – 1008, 1007f, 1008f, 1010, 1011f – 1013f, 1012 – 1013, 1014t
diferencias químicas entre conos y, 1016
segmentos externos, 1006
BCAA aminotransferasa, 811
Beaumont, William, 1082
Beer-Lambert, relación, 453 – 454
Benzo[a]pireno, 192
metabolismo del, 476 – 478, 478f
Benzo[a]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido, 477
Benzodiazepinas, 993, 993f
Beriberi, 1149 – 1150
Betaína, 794, 794f
BH4. *Véase* Tetrahidrobiopterina
Bicapa lipídica
estabilidad, 503 – 504
estructura, 503, 503f
fluidez, 503 – 504, 509, 509f
modelo, 504f
proteínas integrales de membrana en, 505 – 507, 506f
temperatura de cambio de fase, 509 – 510, 510f
Bicarbonato
conservación, 787
para la acidosis láctica, 621ap
secreción, en el jugo pancreático, 1092 – 1093
transporte, 520 – 521, 520f
Bidireccionalidad de la replicación, 177
Bilirrubina, 611, 612, 1071
conjugación, 1071 – 1074
conjugada, plasmática, aumento, 1075ap
destoxificación, 603f
directa, 1073
excreción de la, 675ap
formación a partir de hemo, 1071, 1072f
indirecta, 1073
no conjugada, 1071 – 1074
toxicidad, 1072
transporte en el plasma, 1071 – 1074
Bilirrubina diglucurónido, 1071 – 1074, 1073, 1073f
Bilirrubina UDP-glucuronosiltransferasa
deficiencia, 1075ap
isoenzimas, 1075ap
Bilis, 1084
Biliverdina IX, 1071
Biliverdina reductasa, 1071
Bioinformática, 117, 117 – 120
Biología molecular, dogma central, 28, 28f
Biología molecular de la célula, 989 – 1049
Biopterina, 797 – 798, 799f
deficiencia, 799ap
Biosíntesis reductora, 668
Biotina, 528t, 1153
2,3-Bisfosfoglicerato, 608, 608f
modulador de la disociación de oxígeno, 406, 406 – 407, 406f, 407f
4,5-Bisfosfoinositol glicerofosfolípidos, 497
BPG. *Véase* 2,3-Bisfosfoglicerato
BM3, 467
Bocio, 1162
Bohr, efecto, 403, 406
CO_2 y, 404 – 405
O_2 y, 404 – 405
Bomba vacuolar de protones, 998
Bombas, 514. 522-528. *Véase también* Bombeo de protones
Na^+,H^+, 528t
Na^+,K^+, 522 – 523, 523f, 528f
Bombeo de protones
bomba vacuolar de protones, 998
en el complejo III, 572, 572f
en el complejo IV, 575
Bombesina, 914t
Borde apolar, 124, 126f
Bordes en cepillo, 1084 – 1085
sistemas de transporte específicos, 1100
Boro, 1164
BPG, ruta del, 608f
Bradiquinina, 914t
Brevicán, 688
Bromuro de cianógeno, 147
Bucle-hoja hélice, motivo, 391, 392f
Bucles de retroalimentación, en cascadas de hormonas, 909, 909 – 910, 909f
α-Bungarotoxina, 518
Burbujas de replicación, 178, 179f
Butionina sulfoximina, 820, 820f
Butirato, 898
bZIP, proteínas. *Véase* Proteínas con región básica-cremallera de leucina
C, regiones, 371
Ca^{2+}. *Véase* Calcio
Cadena de transporte electrónico, 553, 564, 564 – 576, 575 – 576, 576f
como sistema multicomponente, 566 – 567, 566f, 567f
complejo I, 567, 567 – 568, 567f, 568f
complejo II, 567, 569 – 570, 569f
complejo III, 567, 570 – 573, 570f
complejo IV, 567, 573 – 575, 574f, 575f
desacopladores e inhibidores, 578 – 579, 578f, 579f
reacciones de oxidación-reducción, 564 – 565, 565t
variaciones de energía libre, 565 – 566

Cadena ligera esencial, 1019
Cadena ligera reguladora, 1019
Cadena respiratoria, 553
Cadenas alquilo, 96f, 695 – 697
Cadenas de globina, producción, cambios relacionados con la edad, 393f
Cadenas de glucosaminoglucanos, unidades repetitivas, 685f
Cadenas polipeptídicas, 113f
  asociaciones no covalentes, 121
  estructura de hoja β, 116f
  estructura β, 115f
  estructura β antiparalela, 115f
Cahn-Ingold-Prelog, sistema, 1172
Caja CAAT, 353
Caja CG, 353
Caja TATA, 353
Calcio, 1159 – 1161
  como mensajero intracelular, 523 – 524
  como segundo mensajero, 524, 653
  deficiencia, 1160 – 1161
  en la glucogenólisis, 659 – 660, 659f, 660f
  en la secreción de aldosterona, 967
  en la síntesis de esteroides, 963, 967
  homeostasis, vitamina D en la, 1142, 1144, 1145f
  liberación a partir de reservas intracelulares, 928 – 931, 930f
  metabolismo, 1142, 1144, 1145f
    en la osteodistrofia renal, 1143ap
  necesidades en la dieta e ingestión de proteínas, 1124
  papeles fisiológicos, 1159 – 1161
  requerimientos, 1160
  transporte, en células de mamíferos, 528t
  transporte mitocondrial, 585 – 586, 586f
  transporte primario activo, 523 – 524
  unión a calmodulina, 653
  y contracción muscular, 1025, 1025f, 1027
    del músculo liso, 1030 – 1031, 1030f
  y fluidez de las membranas, 510 – 511
  y glucogenólisis hepática, 659, 659f
  y osteoporosis, 1159 – 1161
  y presión sanguínea, 1161
Calcio-calmodulina, complejo, 523 – 524, 525f, 997
Calcio-calmodulina quinasa, 996, 997
Calcitonina, 915t
Calcitriol. *Véase* 1,25-Dihidroxi vitamina D_3
Cálculos de colesterol, 1109
Calicreína, 1035
Calmodulina, 488, 440, 524, 653
  unión de calcio, 523 – 524, 525f
Calorías, 1118
Calpaínas, 273
Caltrina, 273, 941, 941 – 943, 943f
CaM quinasa. *Véase* Calcio-calmodulina quinasa
Cambio conformacional, 333
Cambio de la pauta de lectura, mutaciones de, 193, 239
  VIH, 241ap
Cambio de sentido, mutaciones de, 193, 193f, 238, 238ap
Cambios ligados a progresión, 849
Cambios ligados a transformación, 849
cAMP, 545, 623, 826, 878 – 879
  control de *lac*P por, 337f
  en la activación de la proteína quinasa A, 624, 624f, 927f, 928
  en la glucogenólisis, 659, 659f, 660f
  en la síntesis de hormonas esteroides, 963
  estructura, 623f
  niveles intracelulares de, aumento en los, 626
cAMP, elementos de respuesta a, 641
cAMP fosfodiesterasa, 626
Canal(es)
  de membrana, 512 – 513, 513t, 516 – 518. *Véase también* Transporte a través de membrana
    estructura, 516, 516f
    funciones, 516, 516f
    ionóforos y, 529, 529t
    regulación, 516 – 518, 518ap
  regulados por el voltaje, 516
Canal aniónico, eritrocito, 506, 507
Canal epitelial de sodio, 1090 – 1091
Canal nicotínico de la acetilcolina, 518
  en la contracción muscular, 518
  inhibidores, 518
  regulación, 518
  subunidades, 518
Canales de cloruro, 516
  en la fibrosis quística, 516, 518ap, 1093ap. *Véase también* Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
  epitelio intestinal, 1092 – 1093
  estructura, 516 – 517
  regulación, 516 – 517
Canales de sodio, 516, 1010
  en el epitelio intestinal, 1090 – 1091
  estructura, 516 – 517, 517f
  regulación, 516 – 517
Canales iónicos
  con compuertas de voltaje, enfermedades, 1026ap – 1027ap
  enfermedades del músculo cardíaco y, 1027ap
  regulados por el voltaje, 516, 993
Canales regulados por voltaje, 516, 993
Cáncer. *Véase también* Anticancerígenos
  antibióticos antitumorales, 49ap
  caquexia, 893ap
  de colon hereditario no poliposo, 198
  de mama, 955ap
    quimioterapia del, 955ap
  factores de transcripción en la carcinogénesis, 217ap
  prevención del, 1158
  quimioterapia. *Véase* Quimioterapia
  riesgo de, 1126, 1140
  telomerasas como diana, 56ap
  topoisomerasas, 65ap
  y ciclo celular, 180ap
  y reparación de apareamientos erróneos, 198ap
CAP. *Véase* Proteína activadora de catabolitos
Caquexia, 787
  cáncer, 893ap
Cara B, de estructura enzimática, 427
Carbamazepina, 483
Carbamil fosfato, 788, 788f
Carbamil fosfato sintetasa
  deficiencia, 790ap
  I, 788, 840
  II, 788, 840 – 841, 841 – 843, 843f
Carbamino-hemoglobina, 405, 406f
Carbónico anhidrasa, 428, 631
Carbono, átomo de, 1171, 1172
γ-Carboxiglutamato, residuos, 1035
  papel en los factores de coagulación, 1045 – 1046, 1046f
γ-Carboxiglutamilo, proteína que contiene, 1034
Carboxilación, 1152
  protrombina, 1146 – 1147
Carboxina, 575
Carboxipeptidasa, 428, 429f, 1097
  A, 1098t, 1099
  B, 1098t, 1099
  pancreática, 1099
Carcinógeno, 477
Cardiolipina, 496, 563, 729 – 730, 730f. *Véase también* Fosfatidilglicerol fosfoglicérido
Cardiomiopatía
  dilatada, 1022c
  hipertrófica familiar, 1019ap
Carga glucídica, 890
  y resistencia atlética, 1125ap
Cargadores de la abrazadera, 175
Carnitina, 713 – 714, 871
  en el transporte de grupos acilo, 713 – 714
  fuente, 871, 873f
  síntesis, 815 – 816, 816f
  transporte, deficiencia en el, 715ap
Carnitina palmitiltransferasa
  deficiencia, 715ap
  I y II, 713 – 714
Carnosina, 817, 818f, 1099
β-Caroteno, 1140
Carotenoides, 1139, 1140
Cascada anti-apoptótica Akt/NF-κB, 953
Cascada hormonal, sistema de, 906, 907 – 912, 907f, 909f
  cíclicas, 931 – 936
Caset fijadora de ATP, proteínas transportadoras con, 525 – 526
Caspasas, 274
Catabolismo, 538
Catabolito, represión por, 337f, 338
Catalasa, 22, 22f, 417, 722
Catálisis, 414
  ácido-básica, 444 – 445
  covalente, en el centro activo de la quimotripsina, 447f
  dependencia de la temperatura, 450 – 451, 451f
  mecanismo, 443 – 452
  parámetros ambientales, 450 – 451
Catálisis ácido-básica, 444 – 445, 445f
Catálisis covalente, 446, 446, 447f, 448
Cataratas, 1004, 1004 – 1005
Cataratas seniles, 1005
Catecol oxigenasa, 417, 417f
Catecolaminas, 892. *Véase también* Adrenalina
  neurotransmisores, 1000, 1000f
  síntesis, 799 – 801, 800f
Catecol-*O*-metiltransferasa, 1000, 1000f
Catión(es), 7, 16
Cavidades recubiertas, 941
CBG. *Véase* Globulina de fijación, de corticosteroide
CD44, 688
CDGSs. *Véase* Síndromes de glucoproteína deficiente en glúcidos
cDNA. *Véase* DNA complementario
CDRs. *Véase* Regiones determinantes de la complementariedad
Cebado, DNA polimerasas, 166 – 167, 168f
Cebado al azar para marcar sondas de DNA, 296
Cebador, 163, 166
  eliminación, 167
Cefalinas, 496, 1177. *Véase también* Fosfatidiletanolamina
Ceguera nocturna, en la deficiencia de vitamina A, 1141
Celobiosa, estructura, 1175
Célula(s)
  animal, estructura, 14f
  alteraciones coincidentes en, 850
  biología molecular de la, 989 – 1049
  ciclo, 848, 849f
  citoesqueleto, 22
  composición química, 6t, 15 – 17
  crecimiento, inhibición, 857

distribución de nucleótidos, 827
división, y enzimas metabolizantes de nucleótidos, 848 – 850
en rápida división, catabolismo de la glutamina en, 868
fluido, constituyentes químicos, 16f
medio celular, 6 – 14
membrana, 14
membrana plasmática, 17
metabolismo, rutas *de novo*, 854 – 855
mioblasto, 1016
regulación y secreción hormonal, 925 – 931
tumorales, 850
y compartimientos celulares, 4 – 6
Células cardíacas, 602
Células COS, expresión de genes foráneos en, 312, 312f
Células de tipo enterocromafina, 1086 – 1087
Células diana, 908
Células endocrinas epiteliales, 1087
Células eucarióticas
composición, 14 – 17
DNA, 74 – 75, 75f
estructura, 67 – 71, 67f
replicación, 175, 176f, 177
estructura y función, 5f, 6t, 14 – 24, 14f
mRNA, 84 – 85, 84f, 85
organización, 5f, 14 – 1
reclutamiento de enzimas durante la transcripción, 223, 225 – 227
transcripción, 214 – 220
cromatina activa, 214 – 215, 215f
RNA polimerasa, 215 – 220, 216f, 218f – 220f
transfectadas
expresión de genes foráneos en, 312, 312f
marcadores para la selección de, 311 – 312
vectores de expresión en, 310 – 312
Células exocrinas, 1085
Células I, enfermedad de las, 262, 263ap, 682ap
Células mioblásticas, 1016
Células musculares, 602
Células procariotas. *Véase* Procariotas
Células suprarrenales de la zona
fasciculada, en la síntesis de esteroides, 964
glomerulosa, en la síntesis de esteroides, 964
reticular, en la síntesis de esteroides, 964
Células tumorales
cambios bioquímicos en, 850
metástasis, 379ap
Celulosa, 1082, 1127, 1127t, 1175
Centimorgan, 186
Centro activador, 437
Centro activo, 415, 440 – 443
Centro de fijación
asimetría, 441, 443
de coenzimas, enfermedades causadas por mutación del, 426ap
Centrómeros, 67
Centros alostéricos, 415, 436
frente al centro de fijación de sustrato en la gota, 437ap
Centros ferrosulfurados, 556
Ceramida(s), 498 – 499, 499f, 755, 755f – 757f, 1177
oligosacáridos de, 1177
Ceras, 1175
Cerdo en escabeche e hipertermia maligna, 621
Cerdos, síndrome del estrés en, 621ap
Cerebélica, ataxia, 719ap
Cerebro, 602
composición, 991
en el metabolismo glucídico, 599 – 600, 602
requerimiento de glucosa, 990 – 991
velocidad de recambio de proteínas, 991
Cerebrocán, 688
Cerebrósidos, 498 – 499, 499, 758 – 759, 758f, 759f, 1177
Ceruloplasmina, 1061
deficiencia, 1061ap
α-Cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, 881
β-Cetoácido, formación, 713
Cetoacidosis, 694, 814ap
β-Cetoacil-ACP sintasa, 700
Cetogénicos, aminoácidos, 634 – 636, 636t, 781
α-Cetoglutarato deshidrogenasa, 1149
Cetoglutarato deshidrogenasa, 555
Cetona(s), *Véase* Cuerpos cetónicos
Cetopentosa, 1172
Cetosis, 712, 722
β-Cetotiolasa, 720
CFTR. *Véase* Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
cGMP, 1010, 1012 – 1013, 1013f
estructura, 950, 950f
papel del, 826
síntesis, 950
Chaperona, proteína, 133, 255, 255 – 256, 1067
Chaperoninas, 133, 135f, 255
Choque térmico, proteínas, 133, 975
Cianuro, 575
destoxificación, 808f
envenenamiento por, 577ap
Ciclo ayuno-alimentación, 862, 862f, 864 – 876
Ciclo celular, 178, 178 – 180, 180f
y cáncer, 180ap
Ciclo de Cori, 629 – 631, 630f, 865
Ciclo de Krebs. *Véase* Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Ciclo de la alanina, 629 – 631, 630f, 866
Ciclo de la glucosa-ácido graso, 882
Ciclo de la urea, 787 – 790, 789f
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, 547, 552 – 553, 552 – 561, 553f, 787, 990 – 991
conversión del grupo acetilo a CO_2 y H_2O, 557 – 558
frente a ruta de las pentosas fosfato, 666
fuente de intermediarios biosintéticos, 558 – 559, 559f
reacciones, 553 – 557, 554f, 556f
reacciones anapleróticas que restablecen intermediarios, 559 – 560, 560f
regulación, 560 – 561, 561f
Ciclo del ácido cítrico. *Véase* Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Ciclo del fosfatidilinositol, 967
Ciclo del ovario, 932, 932 – 933, 935f
ausencia de fertilización y, 934 – 936
fertilización y, 936, 936f
muerte celular programada en el, 985ap
regulación por GnRH, 932 – 936, 933f
Ciclo del γ-glutamilo, 527, 527f, 819, 820f
Ciclo intercelular de la glutamina, 785, 785f
Ciclo menstrual, cambios de humor durante el, 800
Ciclooxigenasas, 432ap
COX-1, 978
COX-2, 978
formas, 768 – 769
síntesis de prostaglandinas, 767 – 770, 767f – 769f
Ciclopentanoperhidrofenantreno, 960
Ciclos de Edman, 147
Cigarrillos, humo de los, 478
Cinc. *Véase* Zinc
Cinética, 418 – 426
Cinética de saturación, 512f, 514
Circulación enterohepática, 1111, 1111f, 1112, 1112f
Cirrosis, 893 – 894
Cirugía, efectos metabólicos, 892
cis-Aconitato, 554
Cisaprida (Propulsid), 481ap
Cisplatino, 195
Cistationasa, 803
carencia de, 805ap
reacción catalítica, 426ap
reacciones catalizadas por, 808
Cistationina sintasa, 803
deficiencia, 805ap
Cistationuria, 805ap
Cisteína, 97
en niños, 782
estructura, 1179
síntesis, 803, 804f, 807 – 808, 807f
Cisteína 93 de las cadenas β (βCys^{93}), 407 – 408, 408f, 409f
Cisteína proteasas, 378
cisteína 93 de las cadenas β (βCys^{93}), 407 – 408, 408f, 409f
Cisteína sulfinato, 807, 807f
Cistina, 100, 100f
Cistina aminopeptidasa, 924
Cistinosis, 805ap
Cistinuria, 529ap, 805ap
Citidina, 30, 30f
Citocromo(s), 430, 567, 571 – 572, 571f
Citocromo *b*, 570, 570f
mutaciones, intolerancia al ejercicio relacionadas con, 589ap
Citocromo b_5, 469, 704
Citocromo *b*c1, 567
Citocromo *c*, 140f, 567
como transportador de electrones móvil, 573, 583f
Citocromo *c* oxidasa, 573 – 575, 574f, 575f, 1163
Citocromo *c*1, 570, 570f
Citocromo oxidasa, 415t, 416
Citocromo P450, 18, 465 – 485
bacteriano, 486
clasificación general y descripción de la reacción global, 466 – 468, 466f, 467f
en la síntesis de esteroides, 964
en la toxicidad hepática inducida por paracetamol, 480ap
especificidad de sustrato, 471 – 480, 472f
metabolismo de compuestos endógenos, 475 – 476
oxidación de sustratos lipofílicos exógenos, 476 – 480, 476t, 477t, 478f, 479f
síntesis de hormonas esteroides, 472 – 475, 473f, 475f
familia, 470
inhibidores, 480 – 482
interacción entre fármacos y efectos adversos, 481ap
mitocondrial, 469
nomenclatura, 470 – 471, 471t
regulación de la expresión, 482 – 485
inducción, 482 – 484, 483f, 484ap
polimorfismos genéticos, 484 – 485, 485ap
secuencia de reacciones, 467f
sistemas de transporte electrónico, 468 – 470, 468f
NADPH-adrenodoxina reductasa, 469, 470f
NADPH-citocromo P_{450} reductasa, 468 – 469, 469f
Citocromos tipo *a*, 571, 571 – 572, 571f
Citocromos tipo *b*, 571, 571f

Citocromos tipo *c*, 571, 571f
Citoesqueleto, 22
Citomegalovirus humano, vectores de expresión en, 311
Citoplasma, 18
Citoquinas, 487
  respuesta inmunitaria e inflamatoria mediadas por, 978f
Citosina, 29, 29f, 30, 828, 829
Citosina arabinósido, 854, 854f, 855f
Citosol, 22, 703f, 714f
Citotoxicidad, 487
Citrato, 553, 622, 618
  transporte de unidades de acetilo, 585, 585f
Citrato liasa, 559
Citrato sintasa, 553, 636
Citrulina, 788, 789, 870
Cl^-/HCO_3^-, intercambiador de, 520 – 521, 1091, 1092f, 1096
Clase K, enzimas, 437
Clase V, enzimas, 437
Clonación, 323
  múltiples sitios de, 289
  vector de, 288
Clonación direccional, 289 – 290, 290f
Cloranfenicol, inhibición de la síntesis de proteínas, 255
Cloridorrea familiar, 1092ap
p-Cloromercuribenzoato, 433
Cloruro de sodio
  absorción, 1090 – 1091
    electrogénica, 1090 – 1091, 1091f
    y cloridorrea familiar, 1092ap
  movimiento transepitelial, 1090 – 1091
  secreción epitelial, 1092 – 1094, 1093f
CoA. *Véase* Coenzima A
Coagulación sanguínea, 371ap, 1031 – 1049, 1032t
  calcio en la, 1159
  factores, 382f
  fase de anticoagulación, 1031, 1041 – 1045
    inactivación de FVa y FVIIIa, 1043 – 1045, 1044f
  fase de fibrinólisis, 1031, 1045, 1045f
  fase de procoagulación, 1031, 1033 – 1041, 1033f
    formación de trombina, 1034
    formación de un tapón plaquetario, 1039 – 1041, 1040f
    reacciones de las rutas intrínsecas, 1033f, 1034 – 1039
    rutas extrínsecas e iniciación de la coagulación, 1033 – 1034
  inhibición de la ruta extrínseca, 41 – 42, 42f, 43f
  papel de la vitamina K en las reacciones de las carboxilasas de proteínas, 1047 – 1049, 1047f
  proteínas que contienen Gla
    control de la síntesis, 1048f, 1049
    papel de los residuos en los factores de coagulación, 1045 – 1046, 1045f
  y estreptoquinasa, 458
  y plasmina, 458
  y plasminógeno, 458
  y terapia con heparina, 685ap
Coágulo blando, 1035, 1035 – 1036
Coágulos sanguíneos, y estreptoquinasa, 458
Cobalamina. *Véase* Vitamina B_{12}
Cobalto, en la vitamina B_{12}, 1156
Cobratoxina, 518
Cobre, 567
  absorción, 1163
  asignación dietética recomendada, 1163
  como cofactor, 1162 – 1163
  deficiencia, 1163
  en la activación de oxígeno molecular, 430, 431f
  metaloenzimas, 1163
  requerimientos, 1163
Cociente respiratorio, 890
Cociente según la ley de acción de masas, 614 – 616
Cockayne, síndrome, 229ap
Código genético
  descifrado, 237, 237t
  universalidad del, 235
Codones
  de terminación, enfermedades, 238ap
  interacciones con anticodones, 236 – 239, 236f, 237t
  mRNA, 235, 236t
  posición degenerada, 237
  sin sentido, 236
  terminación, 236
Coeficiente de extinción molar, 151
Coeficiente de Hill (nH), 399t
Coeficiente Svedberg, 142, 142f, 142t
  y masa molecular, 142f
Coenzima(s), 426
  centro de fijación, en la cistationuria, 426ap
  componentes, 827
  derivadas de vitaminas B, 426ap
  enfermedades causadas por mutaciones en el centro de fijación, 426ap
  estructura y función, 426 – 431
Coenzima A, 850 – 852, 852f
Coenzima Q. *Véase* Ubiquinona
Coenzimas de flavina, espectro de absorción, 455f
Coenzimas de nicotinamida, espectros de absorción, 455
Cofactores, 414
Cofactores metálicos, en enzimas, 428 – 431
Colágeno, 121
  composición de aminoácidos, 122 – 123, 122f, 122t
  distribución en el cuerpo humano, 121
  estructura, 123 – 125
  síntesis
    anormal, 121ap
    defectos, 270ap – 271ap
    modificaciones postraducción necesarias, 268 – 270, 269f
  formación de enlaces covalentes cruzados, 125, 125f, 126f
  maduración, 269 – 270, 270t
  necesidad de glicina, 124f
  tipos, 123t
  y elastina, comparación, 122t
Colecalciferol. *Véase* Vitamina D
Colecistoquinina, 1098
  acciones, 914t
  como secretagogo, 1086t, 1087 – 1088
  estructura, 1088, 1088t
  orígenes, 914t
Cólera
  toxina del, 760 – 761, 1094ap
  tratamiento, 1094ap
Colesterol, 500, 741 – 754, 1178
  aterosclerosis, 752ap
  cálculos de, 1109
  como precursor de ácidos biliares, 742
  como precursor de esteroides, 741 – 742, 742f
  como precursor de sales biliares, 741 – 742
  en la síntesis de hormonas esteroides, 960, 963 – 966, 965f, 966f
  en membranas, 500
  en micelas mixtas, 1107, 1109ap
  enfermedad de almacenamiento de ésteres de, 21ap
  estructura, 500, 501f, 960f
  excreción, 752 – 753, 752f, 753f
  formas, 741, 741f
  hipercolesterolemia, 751ap
  niveles plasmáticos/séricos
    dietas vegetarianas y, 1129
    e ingestión, 1128 – 1129, 1129ap
    y dieta, 1128 – 1139, 1129ap
  rotura de cadena lateral, 472, 473f, 964
  síntesis, 1128
    regulación de la, 750 – 753, 750f
  transporte, 747, 748f
  y fluidez de las membranas, 510 – 511, 510ap
  vesícula biliar, 1109ap
Colestiramina, interacciones fármaco-nutrientes, 1165t
Colicina E3, inhibición de la síntesis de proteínas, 255
Colina, 794, 794f, 1154
Colina aciltransferasa, 998
Colipasa, 1105
Colitis, 899
Colon
  fermentación bacteriana en el, 898 – 899, 899f
  recuperación de energía por el, 898 – 899, 899f
Colonocitos, 898 – 899, 899f
Color
  visión del, 1013 – 1014, 1015f, 1016
  visión tricromática del, 1014
Coma hiperosmolar hiperglucémico, 874ap
Comida(s)
  artificiales, 1164
  contenido energético de los (kcal), 1118
  contribución al suministro diario de nutrientes, 1082, 1082t
  índice glucémico, 1126ap, 1130t
  rápidas, 1164
Compartimentación de enzimas, 459
Complejo calcio-calmodulina, 523 – 524, 525f, 997
Complejo de Golgi, 18
Complejo de inciación
  de la transcripción, 348
  expresión génica en eucariotas, 350 – 357, 351f, 352f
Complejo de la piruvato deshidrogenasa, 640
Complejo de reconocimiento del origen, 177
Complejo de rotura de la glicina, 794, 795f
Complejo final de preiniciación, 246
  expresión génica en eucariotas, 350 – 357, 351f, 352f
Complejo hormona-receptor, 936 – 937
Complejo pol α/primasa, 175
Complejo proteasa-inhibidor, 1041
Complejo SWI/SNF, 349
Complejos ligados por metal, 429
Complejos ligados por sustrato, 429
Complementación-α, 295 – 296, 295f
Complementariedad, 38, 38 – 39, 40f
Complementario, DNA, 302
Complemento, proteínas del, 371ap
Compuerta regulada por ligando, 1010
Compuestos insaturados, 1170
Compuestos quirales, 443
Compuestos ricos en energía, transferencia de enlaces ricos en energía a otros compuestos, 545 – 547, 546f, 547f
Concentración micelar crítica, 502, 1105, 1107f
Condrointina sulfatos, 684, 685f, 688
Conducto arterioso, prostaglandinas y, 770

Conector múltiple, 289
Conexina, 519
Conformación *anti*, del DNA, 32, 32 – 33, 33f
Conformación *endo*, 32, 32f
Conformación R, estado, 403 – 404
  cisteína 93 de las cadenas β (βCys^{93}) y, 407 – 408, 408f, 409f
Conformación semisilla, 446f
Conformación silla estable, 446f
Conformación *syn,* 32, 32 – 33, 33f
Conformación T, estado, 403 – 404
  cisteína 93 de las cadenas β (βCys^{93}) y, 407 – 408, 408f, 409f
Confusión, en la deficiencia de tiamina, 1149
Conjugasa, 1154
Conos, 1007, 1007 – 1008, 1007f, 1008f, 1010, 1011f – 1013f, 1012 – 1013, 1014t
  diferencias químicas entre bastones y, 1016
  segmentos externos, 1006
  visión del color, 1013 – 1014, 1015f, 1016
Constante catalítica, 421
Constante de afinidad (K_a), 422
Constante de asociación (K_a), 422, 937
Constante de disociación (K'_a), 101 – 103, 101t, 102t
Constante de disociación (K_d) del complejo hormona-receptor, 936 – 937
Constante de disociación ácida (K'_a), 101 – 102
Constante de equilibrio (K'_{eq}), 8, 420 – 421, 422, 541, 614
Constante de Michaelis. *Véase* K_m
Constante de proporcionalidad (k), 420
Constante de velocidad k_1, 419
Contenidos energéticos, 543, 543t
Contraceptivos orales
  efectos sobre los niveles séricos de vitamina C, 1158
  interacciones fármaco-nutrientes, 1165t
  mecanismo de acción, 972ap
  requerimiento de folato con el uso de, 1156
  requerimiento de vitamina B_6 con el uso de, 1153ap
Control cronotrópico de la secreción hormonal, 932
Control estricto, 289
Control respiratorio, 560, 560 – 561, 561f
Cooperatividad, 438, 616
  índice de, 399, 399t
  modelos, 439 – 441, 439f
  y alosterismo, 439 – 441
Cooperatividad negativa, 938
Cooperatividad positiva, 399
Coproporfiria hereditaria, 1066t, 1070
Coproporfirinógeno oxidasa, 1070
Coproporfirinógenos, 1065
CoQH2, 567
Corazón
  degradación de glucógeno en el, regulación, 659
  glucólisis en el, 626 – 628, 628f
Cori
  ciclo de, 629 – 631, 630f, 865
  enfermedad de, 647ap
Córnea, 600, 1003
  fuente de ATP, 1003
Corrección de errores, 241
Corrección de pruebas, 164, 164 – 165, 165f, 241
Correpresores, 332, 338, 339
Corrimiento de la movilidad electroforética, ensayo del, 301, 302f
Corte y empalme, 75
Corte y empalme alternativo de mRNA, 265
Corteza adrenal, 472
Corticotropina. *Véase* Hormona Adrenocorticotrópica
Corticosteroides, 1158, 1165t
  globulina de fijación de, 974
Corticosterona, 473
  síntesis, 473
Cortisol, 472, 908, 960, 963
  acciones, 971
  estructura, 961t
  funciones, 961t
  receptores de, 960
  rutas de excreción, 968t
  secreción, 961t
  síntesis, 474, 964, 969t
COS, células, expresión de genes foráneos en, 312, 312f
Cotransfección, 311
Cotransportadores
  Na^+, K^+, $2Cl^-$, 1092 – 1093
  Na^+-monosacárido, 1103
Cotransporte antiparalelo aspartato-glutamato, sistema de, 632
Cotransporte sodio-glucosa, 1094ap, 1095 – 1096
COX-1, 978. *Véase también* Ciclooxigenasas
COX-2, 978. *Véase también* Ciclooxigenasas
Creatina, 818, 871 – 872, 871f
Creatina fosfoquinasa, 456, 1028
Creatinina, 818, 819f, 872
Creatinina quinasa, 429
Cremallera de leucina, 355, 356f, 389, 389f, 390f
  proteínas con región básica-, 355 – 356, 356f
Cresta mitocondrial, 19, 561, 563
Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de, 257ap
Crigler-Najjar, síndrome de, 675ap, 1075ap
Cristalinas α, 1003 – 1004, 1004t
Cristalinas β, 1003 – 1004, 1004t
Cristalinas γ, 1004, 1004t
Cristalino, 1003
  composición, 1003 – 1005, 1004f, 1004t, 1005f, 1005t
  metabolismo glucídico en, 600
Cristalografía de Rayos X, 386t, 388f, 396, 962f
Cromáforos, 151, 151f
Cromatina, 18, 67, 347
  eucariótica, 67 – 71, 67f, 214 – 215, 215f
  formación, 347 – 349, 348f, 349f
  síndrome del cromosoma X frágil, 215ap
Cromatografía de afinidad, 143
Cromatografía de exclusión molecular, 142 – 143, 142f
Cromatografía líquida de alta resolución, 143
Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (HPLC), 143, 144f
Cromatosomas, 68, 69f, 70
Cromo, 1163
  asignación dietética recomendada, 1163
  deficiencia, 1163
Cromosoma X frágil, síndrome del, 194, 215ap
Cromosomas, 67
  cromosoma 3, 1014
  cromosoma 7, 1014
  genoma, 162
  para la visión, 1014, 1015ap, 1016
Cromosomas artificiales de levadura, 307
CRP. *Véase* Proteína receptora de cAMP
CPT. *Véase* Carnitina palmitoiltransferasa
CTP ciclohidrolasa I, 836
CTP sintetasa, 842, 842f, 843f
Cuartetos de G, 54, 54 – 55, 54f, 55f
Cuerno occipital, síndrome del, 271ap
Cuerpo lúteo, 934 – 936, 963 – 964, 971 – 972, 985ap
Cuerpos cetónicos, 547, 712, 868, 1170
  como fuente de energía basada en los lípidos, 712
  en el transporte de triacilglicerol, 712
  en la cetoacidosis diabética, 722
  estructura, 712f
  formación, 720 – 722
  utilización por tejido no hepático, 722
  y lípidos, metabolismo lipídico y glucídico en el hígado, 722f
Curva de saturación de la hemoglobina por el oxígeno, 403 – 404, 404f, 406f
Cushing
  enfermedad de, 709ap
  síndrome de, y obesidad, 862ap
CYP102, 467
D- (dextro-), 1172
Dador de glucosilos, 1140
Dador de protones, 9
dCMP desaminasa, 846, 846f
DDI, 184ap
ddNTP. *Véase* Didesoxinucleosido trifosfato
Dedos de zinc, 354 – 355, 356f, 388, 389f, 980, 981f
Deficiencia de
  4-L-aspartilglucosamina amidohidrolasa, 683ap
  dihidrobiopterina reductasa, 799ap
  fructoquinasa, 673ap
  galactoquinasa, 674ap
  heparán sulfamidasa, 688ap
  iduronato sulfatasa, 688ap
  N-acetilglucosamina sulfatasa, 688ap
  N-acetilglucosaminidasa, 688ap
  xilitol deshidrogenasa, 675ap
  α-L-iduronidasa, 688ap
  β-glucuronidasa, 688ap
Deficiencia múltiple de sulfatasas, 267ap, 688ap
Deficiencias nutricionales subclínicas, 1138
Degeneración del código genético, 235
Degeneración macular, 1006ap
Deleción, mutaciones de, 312 – 313, 314f
Dendritas, 991, 991f
Densidad electrónica, mapa de, 149, 150f
Derivados 5′-nucleótido, 827
Dermatán sulfato, 684 – 685
Dermatitis, 1148
Desacetilasas, 687 – 688
Desacopladores, sistema transporte electrónico-fosforilación oxidativa, 578, 578 – 579, 579f
Desalquilación, 471
  reacciones 471
Desaminación, 191, 192f
Δ^9-Desaturasa, 1163
Desaturasa, 704
Descarboxilación, 675 – 677
Descarboxilasa dependiente de piridoxal, 784f
Descarboxilasas, 418
Deshalogenación, reacciones de, 471
Deshidratasas, 418
Deshidroepiandrosterona, 963
  estructura, 961t
  funciones, 961t
  secreción, 961t
  síntesis, 964
Deshidrogenación, 666 – 668, 667f, 713
3β-ol-Deshidrogenasa, 964
Deshidrogenasas, 416
Deslizado, DNA incorrectamente apareado, 56 – 58, 57f
Desmetilación enzimática, 198 – 199, 199f
Desmineralización de los huesos, 1144, 1163
Desmosina, 126, 126f
Desnaturalización, 139f
  DNA, 42 – 43, 42f, 43f

Desnaturalizantes, 41, 41, 41t
Desnutrición, 1122, 1138
Desnutrición proteica y energética, 1122
Desoxiadenosina, 30, 30f
  estructura, 828f
Desoxicitidina, 30, 30f
Desoxicorticosterona (DOC), 472
2-Desoxi-D-ribosa, 29
2-Desoxiglucosa, 613, 613f
Desoxiguanosina, 30, 30f
Desoxihemoglobina
  enlaces salinos entre subunidades, 402f
  impedimento estérico entre la histidina próxima y la porfirina en, 400f
  interfase β-β y, 406 – 407, 407f
  transición a oxihemoglobina, 402f
Desoxihexosas, 675 – 677
Desoximonosacárido, 1173
Desoxirribonucleósidos, 30, 30f
2′-Desoxirribonucleótidos, 827, 843f
Desoxirribonucleótidos, 843 – 848, 846f
Desoxitimidilato, síntesis, 845 – 846, 856f, 1154
Desoxitimidina, 30, 30f
2′-Desoxiuridina 5′-monofosfato, 844
Desplazamiento de la mella, 296, 296f
Despurinación, 191, 192f
Desrepresión, 338
Destinación lisosómica, 682ap
Detergentes biológicos, 1104 – 1105. *Véase también* Ácidos biliares
Deuteranopía, 1016
Dextrinas, como límite, 1102
Dextrinas límite, 648, 1102
DHEA. *Véase* Deshidroepiandrosterona
Diabetes mellitus, 111ap, 132ap, 618ap, 694, 1124, 1125
  cataratas, 1005
  cetoacidosis, 721ap, 722
  coma hiperosmolar hiperglucémico, 874ap
  complicaciones, 874 – 875, 874ap, 889ap
  dependiente de insulina (IDDM), 888 – 889, 888ap
  desencadenante, en la obesidad, 1124
  gestacional, 946ap
  no dependiente de insulina (NIDDM), 886 – 888, 887ap, 887f
  tratamientos dietéticos, 1126ap
  typo 1, 888 – 889, 888ap
  typo 2, 886 – 888, 887ap, 887f
1,2-Diacilglicerol(es). *Véase* Diacilglicerol(es)
1,2-Diacilglicerol 3-fosfato. *Véase* Ácido fosfatídico
Diacilglicerol(es), 497, 498, 654 – 655, 659, 659f, 696, 1086, 1176
  activación de la ruta de la proteína quinasa C, 931
  como segundo mensajero, 930, 930f
  formación, 930, 930f
Diagnóstico de enfermedades
  análisis de aminoácidos en el, 146ap
  enfermedades genéticas, secuenciación directa de DNA para, 287ap
  y medida de isozimas, 456 – 457
Diarrea
  en la deficiencia de vitaminas, 1148
  por bacterias toxigénicas, 1094ap
  terapia de reposición de electrolitos, 1094ap
Diastereómeros, 1171
6-Diazo 5-oxo-L-norleucina, 856, 856f
Dibásicos, ácidos, 1179
Dicumarol, 1048, 1147
Didanosine, 184ap
Didesoxihexosas, 675 – 677
Didesoxinucleósido trifosfato, 285, 285 – 287, 285f, 286f
Didesoxirribonucleótidos, 184, 185
Dieta
  americana, 1164
  ricas en hierro, hematocromatosis tipo I y, 1062ap
  y equilibrio nitrogenado, 781 – 782
  y osteoporosis, 1160ap
Dieta, objetivos en los Estados Unidos, 1131 – 1132, 1131f
Dieta estadounidense, 1164
Dietas vegetarianas, 1122
  consideraciones nutricionales para las, 1164
  y deficiencia de vitamina B_{12} (cobalamina), 1157
  y necesidades proteicas y energéticas, 1121ap, 1122, 1122
Difenilhidantoína y requerimientos de vitaminas, 1148ap
Difosfatidilglicerol, 496, 498t. *Véase también* Fosfatidilglicerol fosfoglicérido
2,3-Difosfoglicerato. *Véase* 2,3-Bisfosfoglicerato
Difracción de neutrones, 149
Difracción de rayos X, 148, 381f
Diftamida, 268, 268f
  inhibición de la síntesis de proteínas, 255
Diftérica, toxina, inhibición de la síntesis de proteínas, 255
Difusión, 511 – 512. Transporte a través de membranas
  de moléculas, a través de membranas, 504, 512, 512f
  de proteínas y lípidos, en membranas, 509 – 511
  facilitada, 519 – 520
  primera ley de Fick, 512
  velocidad de, 511 – 512, 512, 512f
Digestión, 1084 – 1088
  conocimiento de la, perspectiva histórica sobre el, 1082
  de glúcidos, 1100 – 1103, 1102f
  de lípidos, 1104 – 1110, 1104f
  de péptidos, 1099
  de proteínas, 1097 – 1100, 1097f
  intracelular, 20, 20 – 22, 21f, 1085
  intraluminal, 1084
  visión general, 1082
Digital, 523
Dihidrobiopterina reductasa, deficiencia de, 799ap
Dihidroesfingosina, 498, 499f
Dihidrofolato reductasa, 435, 1154
  gen, como marcador de selección de células transfectadas, 311
Dihidrolipoil transsuccinilasa, 555
Dihidropirimidina deshidrogenasa, 848
Dihidropirimidinasa, 848
Dihidrotestosterona, 967
Dihidrouracilo, 1179
1,25-Dihidroxi vitamina D_3 (1α, 25-dihidroxicolecalciferol), 972, 972 – 973, 972f, 1142, 1144
  en la insuficiencia renal, 1143ap
  estructura, 961t, 972f
  funciones, 961t
  mecanismo de acción, 972 – 973, 973f
  rutas de excreción, 968t
  secreción, 961t
  síntesis, 960, 972, 972 – 973
    regulación hormonal, 969t
Dihidroxiacetona, 668, 1172
Dihidroxiacetona fosfato, 707, 707f, 708f
Dihidroxifenilalanina
  para la enfermedad de Parkinson, 801ap
  producción, 800
Dihidroxiquinona, 1047
Diisopropilfluorofosfato, 385
  reacción con la serina proteasa 378f
Diisopropilfosfofluoridato, 1099
Dimerización, de receptores monoméricos esteroides, 979, 980f
Dímeros de pirimidina, 192, 192f
Dinámica molecular, 139
Dineína, 22
Dioxigenasas, 415f, 416
Dipalmitoil-lecitina
  en la función pulmonar, 730 – 732, 731f
  síntesis, 726, 726f
Dipeptidasas, 1085, 1099
Dipeptidil aminopeptidasa IV, 1085t
Dipéptidos, 98
  transporte mediado por transportador, 1099 – 1100
Dipolo, 6, 6f
Direccionalidad, enlaces fosfodiéster, 34
Dirigidos al sitio activo, sustratos, 380
Disacaridasas, 1085
  deficiencia, 1103ap
Disacáridos, 1100 – 1103, 1102, 1174
Disociación, 7 – 11
Dispersión óptica rotatoria, 152
Distancia de contacto de Van der Waals, 138, 138t
Distribución electrónica, 149
Disulfuro isomerasas, 266, 266 – 267
Diuréticos, interacciones fármacos-nutrientes, 1165t
DMT 1. *Véase* Transportador(es), de metales divalentes 1
DNA, 18, 28, 28 – 29, 28 – 77. *Véase también* Gen(es); Transcripción
  amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa, 281 – 282, 281f
  análisis de proteínas de unión, 301 – 302
  B-DNA, 388f
  bZIP GCN4, estructura, 390f
  bases. *Véase* Base(s)
  capacidad de almacenamiento de información, 29
  cebado al azar para marcar sondas de DNA, 296
  chips, aplicaciones médicas y genéticas, 45ap
  clonación
    direccional, 289 – 290, 290f
    frente a reacción en cadena de la polimerasa, 291, 293
  complejo de preininciación en eucariotas, 350 – 357, 351f, 352f
  complejos binarios, 391f
  complejos ternarios, 391f
  conformación *anti*, 32, 32 – 33, 33f
  conformación B, 387f
  deleción, 312 – 313, 314f
  desnaturalización, 42 – 43, 42f, 43f
  doble hélice (dsDNA), 38
  doble hélice, 36 – 48, 37, 37f – 40f
    conformaciones, 44, 45f, 46 – 48, 46f, 47t, 48f
    desnaturalización y renaturalización, 42 – 44, 42f – 44f
    factores estabilizadores, 41 – 42, 41t
    hibridación. 44
    modelo de Watson-Crick, 38 – 40, 38f – 40f
    polimorfismo estructural, 46
    surco mayor, 38f, 40, 46f
    surco menor, 38f, 40, 46f

estructura, 33 – 71
antibióticos antitumorales que cambian la forma del DNA, 49ap
circular, 59 – 66, 59f – 61f
conformacional, 44, 45f, 46 – 48, 46f, 47t, 48f
cruciforme, 49 – 50, 50f
de hebra cuádruple, 54 – 56, 54f – 56f
de triple hebra, 50 – 53, 51f – 53f
deslizado, 56 – 58, 57f
DNA curvado, 48 – 49
en células eucarióticas, 67 – 71, 67f
en células procarióticas, 66 – 67, 66f
polinucleótido, 33 – 36, 33f, 34f
extremos pegajosos o cohesivos, 287
extremos romos, 288
fragmentos, transferencia Southern, 297 – 298, 297f
fragmentos largos, análisis, 307 – 309
genómico, marcaje, 349
hibridación, 44
homodímero NF-κB, estructura, 392f
interacción con proteínas
motivos comunes, 354 – 357, 355f – 357f
y transcripción del operón *lac*, 337
lesiones, 191 – 192, 192f
longitud de contorno, 58, 58 – 59
mapas de restricción, 282 – 284, 283, 283f
metilación, activación génica, 349 – 350, 349f, 350l
motivo hélice-vuelta-hélice de la proteína represora de lac, 388f
mutaciones. *Véase* Mutaciones
plásmidos para la clonación direccional, 289f
proteína de unión a TATA, 391f
recombinación, 186 – 191, 186f
general, 186
homóloga, 186
modelo de corte de doble cadena, 189f, 289 – 290
modelo de Holliday, 186, 187f, 188
modelo de Meselson-Radding, 188 – 189, 188f, 189
no homóloga, 186, 190 – 191
principales enzimas, 190
regiones flanqueantes, evaluación mediante mutaciones de deleción e inserción, 312 – 313, 313f
renaturalización, 43 – 44, 44f
reparación, 191 – 203
a pequeña escala, 195
acoplada a la transcripción, 196, 196 – 197, 228 – 229
bloqueo por lesiones, 200
de apareamientos erróneos, 197, 197 – 198, 198f
de huecos en la hebra hija, 200, 200 – 201, 201f
desmetilación enzimática, 198 – 199, 199f
fotorreactivación, 199, 199 – 200, 200f
lesiones del DNA, 191 – 192, 192f
mutaciones, 192 – 194, 193f
regulación, 202 – 203, 203f
reparación por escisión, 194 – 196, 194f, 194t, 195f
roturas de cadena doble, 202
síntesis a través de la lesión, 201, 201 – 202, 201f
repetición invertida, 76 – 77
replicación, 162 – 186, 163f, 163t, 848
ciclo celular, 178 – 180, 180f
DNA polimerasas, 163 – 166, 164f, 165f, 165t
en tres dimensiones, 172 – 173, 173f
enzimas eucarióticos, 175, 176f, 177
enzimas procarióticos, 173 – 175, 174f
horquilla de replicación, 166, 166 – 172
orígenes, 177, 178f
proceso de iniciación, 177 – 178, 179f
química, 163, 164f
replicación de los genomas, 183 – 184
requerimientos, 163, 163t
secuenciación del DNA, 184 – 186, 185f
semiconservadora, 162, 162 – 163, 163f
terminación en genomas circulares, 181
terminación en genomas lineales, 181 – 183, 181f
secuenciación, 184 – 186, 185f, 284 – 287
directa, 287, 287ap
método de rotura química (procedimiento de Maxam-Gilbert), 284 – 285, 285f
método enzimático interrumpido (procedimiento Sanger), 285 – 287, 286f, 288f
secuencias, 71 – 77
de señalización de la síntesis de RNA, 209, 209f
DNA eucariótico, 74 – 75, 75f
DNA procariótico, 73, 74f
e información genética, 95f
endonucleasas de restricción, 72, 72 – 73, 72f, 73f
repetido, 75 – 77
secuencias reguladoras, modificación enzimática, 314, 314f
segmentos definidos, preparación, 283 – 284
síntesis, 18, 849 – 850
ribonucleótido reductasa en la, 845f
usando transcriptasa inversa PCR, 304 – 305, 304f
sondas de, 295, 295 – 296
subclonación, 307
proteína de unión TATA, 391f
transformación celular por, 28 – 29
vacunas de, 29ap
y dogma central de la biología molecular, 28, 28f
DNA A, 44, 45f, 46 – 47, 46f, 47t
DNA B, 44, 45f, 46 – 47, 46f, 47t
surcos mayores, 387f, 388f
surcos menores, 387f
DNA circular, 59 – 66, 59f – 61f
relajado, 60, 61
superhelicoidal, 60, 60 – 66, 60f, 61f
DNA complementario, 302
genoteca, 303 – 304
modificación, para la clonación, 303 – 304, 304f
síntesis, 303 – 304, 303f
usando transcriptasa inversa PCR, 304 – 305, 304f
DNA cruciforme, 49 – 50, 50f
DNA curvado, 48 – 49
DNA de copia única, 76
DNA de hebra cuádruple, 54 – 56, 54f – 56f
DNA de repetición invertida, 76 – 77
DNA de triple hebra, 50 – 53, 51f – 53f
DNA de unión, 68, 348
DNA girasa, 175
DNA i, 56, 56f
DNA ligasas, 59, 169, 170f, 174, 288
DNA nucleosómico, 348
DNA polimerasas, 163, 163 – 166, 164f, 165f, 165t, 173
actividad exonucleolítica, 164, 164 – 165, 165f
corrección de pruebas, 164, 164 – 165, 165f
DNA recombinante, 287
en agricultura, 319 – 321
en animales, 321 – 323
en genoteca, 290
formación, 287 – 288, 288f
perspectiva histórica sobre, 280 – 281
tecnologías, 318 – 321
transformación bacteriana con, 290
vectores, 288 – 289
DNA satélite, 75
DNA Z, 44, 45f, 47 – 48, 47t
DnaA, 177
DnaB, 177
DnaC, 177
DNA-PK, 190
DNasa, protección frente a la, 336
DNasa I, hipersensibilidad a la, 215
DPG. *Véase* 2,3-Bisfosfoglicerato
Doble hélice. *Véase* DNA, doble hélice, 38
Dodecil sulfato sódico, 143
Dogma central de la Biología molecular, 28, 28f
Dolicol fosfato, 259, 259 – 260, 259f, 680 – 681, 681 – 682
barril β, 119, 119f
barril β de "llave griega", 120, 120f
dominio todo-β, 120, 120f
estructura dominio α,β, 119, 119f, 120f
hoja β retorcida, 119f, 120, 120f
Dolor respiratorio, síndrome del, 731ap
Dolor y prostaglandinas, 770
Dominios de Kringle, 1045
Dominios de unión de ligandos, de receptores, 940, 940f
Dominios inmunológicos, de receptores, 940, 940f
Dominios topológicos, 64, 169
Dominios transmembrana, de receptores, 940, 940f
DON. *Véase* 6-Diazo 5-oxo-L-norleucina
DOPA. *Véase* Dihidroxifenilalanina
DOPA descarboxilasa, 800
Dopamina, 528t, 799 – 801, 801ap, 802f, 1000, 1000f
transportador de, 1000
Dopamina β-hidroxilasa, 430, 431f, 919, 1163
Dopaquinona, producción, 801 – 802
dTMP. See Desoxitimidilato
Dubin-Johnson, síndrome de, 1075ap
dUMP. *Véase* 29-Desoxiuridina 59-monofosfato
Duodeno, absorción de hierro en el, 1058ap
ECC. *Véase* Enterocromafina, células de tipo
Ecuación de Hill, 399
Ecuación de Michaelis-Menten
forma lineal, 424
formulación, 422, 423
Ecuación de Nernst, 565
Edman
ciclos, 147
reacción de, 147, 147f
EF. *Véase* Factores de elongación
EF-1βγ, 251
Efecto Bohr, 403, 406
Efecto de proximidad, 449
Efecto Pasteur, 599, 619
Efectores, 436
Efectores alostéricos, 827, 877 – 879
cambios en, 878f, 882 – 883
características de la unión, 436 – 437
control del metabolismo hepático, 878f, 879f
negativos, 437, 438f, 877 – 879
positivos, 437, 438f, 877 – 879
Efectos entrópicos, 449, 449f
Efectos nucleares Overhauser, 153
EF-G, 251
EF-Ts, 251
EF-Tu, 251
Ehlers-Danlos, síndrome
tipo IV, 270ap
tipo VII, 271ap

Eicosanoides, 768
eIF-4e, 246
eIF-4g, 246
eIF-5, 246
eIP-4a, 246
Eje hipotalámico-hipófisis posterior, 908, 909f, 915 – 917, 917f
Ejercicio
  combustible para el, 889 – 891
  intolerancia, mutaciones en el citocromo *b*, 589ap
  y consumo de energía, 1119
  y glucogenólisis, 643
Ejercicio aeróbico, 889 – 891
Ejercicio anaeróbico, 889 – 891
Elastasa(s), 1098t, 1099
  reactividad frente a sustratos, 380t
Elastina, 125, 125 – 126
Electroforesis, 140
  de 2D, 145 – 146, 145f
Electroforesis capilar, 141 – 142, 142f
Electroforesis de 2D, 145 – 146, 145f
Electroforesis sobre gel de poliacrilamida, 143
Electrolitos, 7, 7 – 9
  actividad, 8
  débil, 8, 8 – 9
  secreción por el epitelio intestinal, 1092 – 1093, 1092f
π-Electrón, interacciones, 138f
Electroosmótico, flujo, 142f
Elemento de respuesta a insulina, 642
Elemento de unión del factor de transcripción, 387
Elementos de control, 331
Elementos de respuesta, 353
  a cAMP, 641
  a glucocorticoides, 977, 977t
  a hormona, 977, 977t
  al hierro, 272, 1059, 1059 – 1060, 1059f, 1060t
Elementos dispersos cortos. *Véase* SINE
Elementos dispersos largos. *Véase* LINE
Elementos palindrómicos extragénicos repetidos (REP)
Elementos REP, 73
Eliminación α,β, 784f
ELISA, 456
  en la detección de las proteínas de la envoltura del VIH, 457f
Embarazo, 891
  cambios hormonales durante el, 891
  ciclo ayuno-alimentación durante el, 891
  equilibrio nitrogenado en el, 782
  producción de hormonas esteroides durante el, 475ap
  regulación de la glucosa sanguínea durante el, 891
  requerimientos de ácido fólico en el, 155ap, 1156
  toxemia en el, 984ap
Emisión fluorescente, 151, 151 – 152, 152f
Empaquetamiento en estructuras de orden superior, 70 – 71, 70f
ENaC. *Véase* Canal epitelial de sodio
Enantiómeros, 1171, 1172
Encaje inducido, modelo de, 441, 441f
Encefalinas, 1002, 1002t
  codificación por un solo gen, 918
  estructura, 918
  síntesis, 918 – 919, 918f
Endocitosis, 20, 21f, 941, 942, 942f
  mediada por receptor, 273
Endonucleasas, 35, 35 – 36
Endonucleasas de restricción, 35, 72, 72 – 73, 72f, 73f, 280, 282, 282 – 284
  en la obtención de mapas de restricción, 282 – 283
  tipo II, 282
Endopeptidasas, 378, 1085t, 1097, 1098 – 1099, 1099
  endopeptidasa 24.11, 1085t
Endorfina(s), 1002, 1002t
β-Endorfina, 912
  acciones, 913t
  orígenes, 913t
  síntesis, 915, 916t
Endotelina
  acciones, 915t
  orígenes, 915t
Energía
  anormalidades genéticas del transporte de, 711ap
  compuestos ricos en, 543, 544t
  conexión de los sistemas que la producen con los sistemas que la utilizan, 538 – 539, 539f
  conservación por conversión del grupo acetilo a CO_2 y H_2O, 557 – 558
  consumo
    cambios relacionados con la edad, 1118
    diferencias entre sexos, 1119
    ejercicio y, 1119
    factores que afectan al, 1118 – 1119
    inanición y, 1119
  fuentes, 643 – 661
  fuentes de la dieta, 864
  ingestión en exceso, 1123 – 1125
  liberada en la hidrólisis, clasificación de compuestos, 543, 544t, 545, 545f
  metabolismo, 826, 1118 – 1119
  necesidades en enfermedades y recuperación de pacientes, 1122 – 1123, 1122ap, 1123
  reservas metabólicas, 872 – 875, 873t
  utilización y almacenamiento, 693 – 723
Energía de activación (E_a), 443
Energía libre, 515, 541 – 542, 542t
  cambios en
    determinación en reacciones enzimáticas acopladas, 545
    reacciones redox, 565 – 566
Enfermedad(es)
  cardíaca, factores de riesgo, 1128 – 1129, 1129ap
  cardiovascular, factores de transcripción, 359ap
  celíaca, 797ap
  consideraciones nutricionales en la, 1164 – 1165
  de almacenamiento de ésteres de colesterol, 21ap
  de almacenamiento de glucógeno, 647, 647ap, 649
  de almacenamiento de lípidos, 761
  de almacenamiento lisosómico, con defectos en la ruta catabólica de los esfingolípidos, 762 – 765, 762f, 763t
  de Alzheimer, 257ap
  de Cori, 647ap
  de Creutzfeldt-Jakob, 257ap
  de Cushing, 709ap
  de Fabry, 683ap, 763t
  de Gaucher, 683ap, 763t
  de glucolípidos, 683ap
  de Hartnup, 529ap, 1100ap
  de Hunter, 688ap
  de Huntington, 194, 257ap
  de Krabbe, 683ap, 763t
  de los aminoácidos sulfurados, 805ap
  de Luft, 19ap
  de Maroteaux-Lamy, 688ap
  de McArdle, 647ap
  de Niemann-Pick, 763t
  de Parkinson, 801ap
  de Pompe, 647ap
  de Refsum, 694, 719ap
  de Sandhoff-Jatzkewitz, 683ap, 763t
  de Tangier de, 128ap
  de Tay-Sachs, 683ap, 763t
  de Von Gierke, 647ap
  de Wilson, 1163
  de Wolman, 21ap
  de las células I, 262, 263ap, 682ap
  de las vacas locas, 257ap
  del metabolismo del metilmalonato, 814ap
  del músculo cardíaco, canales iónicos y, 1027ap
  del tejido conjuntivo, autoinmunidad en, 225ap
  genéticas, tripletes de DNA repetidos, 58ap
  hemorrágica en el recién nacido, 1147ap, 1148ap
  maníaco depresiva, tratamiento con litio, 931, 931ap
  mitocondriales, 588 – 589
  relacionadas con los canales iónicos con compuertas de voltaje, 1026ap – 1027ap
  renal
    deficiencia crónica en la, 1162
    desarreglos metabólicos del nitrógeno y, 894 – 895
    y dietas pobres en proteínas, 1121ap
  miopatías, 589ap
  trombóticas, alteraciones en la ruta de la proteína C, 1044, 1044ap
Enfoque isoeléctrico, 140, 141f
Enlace anomérico, 258
Enlace covalente, energía de enlace, 136t
Enlace fi, 113, 113f
Enlace hidrofóbico, energía de enlace, 136t
Enlace psi, 113, 113f
Enlaces disulfuro, 1172
Enlaces fosfodiéster, 162, 163
  DNA, 33
    direccionalidad, 34
  RNA, 78, 78f
Enlaces glucopeptídicos, 132f, 680f, 681, 682f
Enlaces iónicos, energía de, 136t
Enlaces glucosídicos, 131, 132f
Enlaces *N*-glucosídicos, 131, 132f, 258, 258 – 259, 681 – 682
Enlaces no covalentes, energía de enlace, 136t
Enlaces *O*-glucosídicos, 132, 132f, 680 – 681
Enlaces peptídicos, 98, 98 – 100, 1170
  configuración *cis*, 99, 99f
  configuración *trans*, 99, 99f
  estructuras electrónicas isómeras, 98
  formación, 98f, 246, 248f – 249f, 250 – 251, 252f, 1171
  rotura, 417
Enlaces ricos en energía o de alta energía, 539
Enlaces salinos. *Véase* Interacciones electrostáticas
  en la desoxihemoglobina, 402f
Enodioles, 1174
Enol fosfatos, 544t
Enolasa, reacciones catalizadas por, 604f, 608
Ensayo(s)
  acoplados, 453 – 455
  bioquímicos, para la evaluación de la malnutrición, 1138
  de inmunoadsorbente ligado a enzima. *Véase* ELISA

de protección frente a la nucleasa, 300 – 301, 301f
del corrimiento de la movilidad electroforética, 301, 302f
para el virus de la inmunodeficiencia humana, 456
Enterocitos, 867, 1084
sistemas de transporte de glucosa en los, 1103, 1103t
Enterocromafina, células de tipo, 1086 – 1087
Enteropeptidasa, 1085t, 1098 – 1099
Enteroquinasa. *Véase* Enteropeptidasa
Entrecruzamientos generados por al-lisina, 125
Entropía, 540, 540 – 541
Entrópicos, efectos, 449, 449f
Envejecimiento, cambios que ocurren en, 885
Envenenamiento
por arsénico, 614ap
por plomo, 1066t, 1068
Envoltura (cubierta) nuclear, 18
Enzarcillamiento, 169
Enzima(s), 414
acilado, intermedio de, 448
actividad específica, 421
alostéricos, 438f
cinética sigmoidea, 437 – 438
clase K, 437, 438f
clase V, 437
polimérico, 438f
subunidades catalíticas, 440, 440f
subunidades reguladoras, 440, 440f
velocidades, 438
aplicaciones clínicas, 452 – 459
bifuncional, 623, 624
bacterianos, en la digestión de glúcidos, 1102
cambios a largo plazo en, 883 – 885
capacidad catalítica, comparación, 421
cara A de, 427
cara B de, 427
cardíacos, liberación después de un infarto de miocardio, 453f
catálisis de la etapa obligada, 459
catálisis de reacciones reversibles, 424
centro activo, 415
centro alostérico, 415
centro de fijación del sustrato, 414 – 415
cinética de saturación, 422 – 424
clase K, 437
clase V, 437
clases, 415
clasificación, 415 – 418, 415t
cofactores metálicos, 428 – 431
como agentes terapéuticos, 458 – 459
como proteínas integrales de membrana, 507
como reactores químicos, 459
compartimentación de, 459
complementariedad con el sustrato, 441 – 443
control alostérico, 436 – 440
deficiencia
en el síndrome de Lesch-Nyhan, 454ap
en la aciduria orótica, 454ap
identificación y tratamiento, 454ap
dependiente de tetrahidrobiopterina, 797, 799f
desestabilización y, 450, 450f
desfosforilación, 880f, 881f, 882
desramificante, 648 – 649, 648f
del glucógeno, 648 – 649, 648f
digestivos, 1084, 1085, 1085t, 1086f
proenzimas, 1085
secreción, 1085, 1086f
efector alostérico, centro de fijación, 437
en el incremento de la velocidad de reacción, 449f
en la gota, 423ap
ensayos para el diagnóstico de esfingolipidosis, 764 – 765, 764f, 765f
especificidad, 414 – 415
centro activo, 440 – 443
estado basal y, 450
eucariótico, 175, 176f, 177
fosforilación, 624, 624f
en el hígado glucogénico, 881f
en el hígado lipogénico, 880f
función, 94
glucosilación, 875ap
hidrolizantes de
ácidos nucleicos, 20t
lípidos, 20t
polisacáridos, 20t
proteínas, 20t
α-hidroxilante, deficiencia genética, 719ap
inducción en el hígado
durante el ayuno, 884f
en el estado bien nutrido, 883f
inducible, 617
inhibición
en la terapia farmacológica, 434 – 436
irreversible, 433
por modificación covalente del centro activo de la cisteína, 433f
inhibición no competitiva reversible, gráfica de dobles recíprocos para la, 433, 433f
inhibición por producto, 424
inhibidor acompetitivo, 433
inhibidores competitivos, 431, 432
inmovilizados, 459
como reactivos, 455 – 456
inmunoensayos, indicadores en, 456
interacción con el sustrato, 421 – 422, 421f. *Véase también* Reacción(es), catalizadas por enzimas
limitantes de velocidad, 459, 460
lisosómicos, 20t
en la gota, 20ap
y sustratos, 20t
málico, 559
ligado a NADP, 703
mecanismo de acción, 422, 424
naturaleza bifásica, 423, 423ap
metabolizantes de nucleótidos, 848 – 850
metabolizantes de lípidos, 747 – 749
modelo de encaje inducido, 441, 441f
modelo de llave y cerradura, 441, 441f
modificación covalente, 433, 879 – 883
modulación por ligandos, 436 – 437
monomérico, 437, 438f
mutado, ambigüedad en el ensayo de, 454ap
nomenclatura, 415
núcleo, 210
oligoméricos, 437, 437
pancreáticos, 1084
activación, 1098 – 1099, 1098f
deficiencia, 1142ap
residuo de serina esencial, 1099
secreción, 1098 – 1099, 1098f
perfil pH-velocidad, 451
plasma
actividades, dependencia con el tiempo de, 452 – 453, 453f
tipos, 452
principales de la recombinación de DNA, 190
procariótico, 173 – 175, 174f
proteolíticos, 378 – 379, 418
características del sitio de unión, 381f
protómero regulador, 440
ramificante, 650, 650f
de glucógeno, 650, 650f
de1,4-α-Glucano, 650
reacciones catalizadas frente a no catalizadas, diagramas de energía para, 444f
reacciones multisustrato, 425 – 426
reclutamiento por la RNA polimerasa durante la transcripción eucariótica, 223, 225 – 227
reemplazamiento, 459
regulación, 459 – 460, 877 – 879
regulación cruzada de, 460, 460f
retroinhibición (inhibición feed-back), 460, 460f
secreción, 1085 – 1086, 1086f
sitio de unión
asimetría, 441, 443
modelo de llave y cerradura, 441f
subclases, 415, 415t
sustrato simétrico, anclaje por tres puntos a un sustrato asimétrico, 443f
temperatura frente a velocidad, 451, 451f
terminología, 421
unidades (U), 421
unidos a matrices insolubles, 459
validez de un ensayo, 455f
velocidad frente a temperatura, 451, 451f
y disminución de la energía de activación, 444 – 450
Eosinófilos, efectos del HETE, 774
Epimerasas, 418
reacciones catalizadas por, 418f
Epimerización, 673f, 674
Epímero(s), 1171, 1172
Epinefrina. *Véase* Adrenalina
Epitelio pigmentado, 1006
Epóxido, 471
Epóxido de la Vitamina K, 047
Epóxido hidrolasa, 477
Equilibrio ácido-base, 102 – 103, 102f. *Véase también* Acidosis; Alcalosis; pH
regulación, 896 – 898
Equilibrio nitrogenado, 781 – 782, 1119 – 1120
factores que afectan al, 1119 – 1120, 1120f, 1122 – 1123, 1122ap
negativo, 781 – 782
positivo, 782
Equivalentes de reducción, 539
Equivalentes de retinol, 1140
Erabutoxina, 518
Ergocalciferol. *Véase* Vitamina D
Ergosterol, 742f
colesterol como precursor, 742
Eritrocitos
banda 3, 520 – 521
canal aniónico, 506, 520 – 521
dominios, 507
metabolismo glucídico en los, 600 – 603
senescente, 1071
transcetolasa, 1149
transporte de glucosa, 520
inhibidores, 520, 520f
vida media, 1071
membrana plasmática
distribución asimétrica de lípidos en, 508 – 509, 509f
estructura, 508, 508f
fluidez, colesterol y, 510ap
Eritromicina
inhibición de la síntesis de proteínas, 255
resistencia de los estafilococos a la, 84ap
Eritropoyetina
acciones, 914t
orígenes, 914t
Eritrosa 4-fosfato, formación, 668
Escherichia coli, 162
diarrea causada por, 1094ap
estructura, 5f

mapa genético de, 331f
operón lactosa, 332 – 338, 332f
operón triptófano, 338 – 343
genes de, 338, 339f
operones biosintéticos, secuencias de péptidos conductores, 342f
reparación de apareamientos incorrectos, 197 – 198, 198f
síntesis de proteínas, control estricto de la, 345, 345f
topoisomerasas, 175
toxina termoestable, 1094ap
Escorbuto, 270ap – 271ap, 1158
Escramblasa, 509
Escualeno, 1178
síntesis de colesterol, 744f – 746f, 745
D-4-Esfingenina. *Véase* Esfingosina
Esfingolípido(s), 498 – 499, 754 – 765, 1175, 1177
ceramidas, 755, 755f – 757f
defectos en la ruta catabólica, 762 – 765, 762f, 763t
en membranas, 498 – 499
enfermedades de almacenamiento lisosómico, 762 – 765, 763t, 764f, 765ap, 765f
esfingomielina, 756, 757f, 758f
glucoesfingolípidos, 756, 758 – 761, 758f – 761f
síntesis de esfingosina, 754 – 755, 754f, 755f
Esfingolipidosis, 762 – 765, 762f, 763t
ensayos enzimáticos para el diagnóstico, 764 – 765, 764f, 765f
Esfingomielina, 756, 757f, 1177
carga sobre, 498t
estructura, 498 – 499, 500f
síntesis, 756, 758f
Esfingosina, 498
estructura, 499f
síntesis, 754 – 755, 754f, 755f
Especies de oxígeno activas, 1003
Especies reactivas de oxígeno, 590 – 592, 590f
defensas celulares contra, 592, 592f
lesiones producidas por, 591 – 592
producción, 590 – 592, 590f, 591f
Especificidad
de moléculas biológicas, factores determinantes, 678
enzima, 414 – 415
Especificidad de unión macromolecular, 387
Espectroscopia de dicroísmo circular, 152, 152, 153f
Espectroscopia de fluorescencia, 151 – 152
Espectroscopia de luz ultravioleta, 150 – 151, 151f
Espermidina, síntesis, 792, 806
Espermina, 792, 806, 835
Espina bífida, 797ap
Estado basal, 450
establecimiento por enzimas, 450
Estado energético, 619
Estado estacionario, 422
Estado nutricional, 1164 – 1165
evaluación, 1164 – 1165
factores que afectan al, 1164 – 1165, 1164f
Estados de oxidación del hierro, 1054
Estados de transición, 443, 448 – 449
análogos del, 444, 444f
Estafilococos, resistencia a la eritromicina, 84ap
Estearil CoA desaturasa, 704, 704
Esteatorrea, 1108
Éster(es), 1170
Esterasas, 1085
Estereasa de lípidos específica, 1105
Estereoespecificidad, 427
Estereoisómeros, 1171
Estereoquímica, 1171
Ésteres de forbol, 654, 655
Ésteres fosfato, 828 – 830
Esterificación, 1171
Esteroide(s), 1177
Esteroides cardiotónicos, 523
Esteroles, 1177
Estigmatelina, 575
Estómago, funciones, 1083f, 1084
Estradiol, 472
17β-Estradiol, 960, 963, 971
estructura, 961t
funciones, 961t
rutas de excreción, 968t
secreción, 961t, 969t, 971 – 972, 971f
síntesis, 969t, 971 – 972, 971f
regulación hormonal, 969t
Estradiol, acciones, 934, 934 – 936
Estrategia de PCR múltiple, 291, 292f
Estrategia en la secuenciación simultánea, 324
Estreptomicina, inhibición de la síntesis de proteínas, 254
Estreptoquinasa y coágulos sanguíneos, 458
Estrés
efectos metabólicos, 892, 893f
hormona del, aldosterona como, 970 – 971
metabólico, consideraciones nutricionales para el, 1164 – 1165
respuesta al, 919
respuesta de las bacterias al, 344
Estricnina, 993
Estrógeno(s), 963, 1178
colesterol como precursor, 742
interacciones fármacos-nutrientes, 1165t
síntesis, 474, 475f
y metabolismo de la tirosina, 800
Estructura en hoja de trébol del tRNA, 79, 80f, 83
Estructura secundaria regular, 113, 113t
Estructura superhelicoidal, 124, 124f
Estructura β del DNA, 115, 151f
Estructuras específicas de tallo y lazo, 1059
Estructuras macromoleculares, 1171 – 1172
Estructuras tautoméricas, 1179
Estudios de ingestión de la dieta en la malnutrición, 1138
Etanol, *Véase* Alcohol (etano); Alcoholismo
Etanolamina, 794, 794f
Etapa obligada, regulación, 459
ETF-ubiquinona oxidorreductasa, 570
Evolución, mapas de restricción y, 284ap
Evolución convergente, 385
Excitón, sistema, 151
Exocitosis, 995, 1085
Exón(es), 75
Exón-intrón, patrones, 383, 384f
Exonucleasas, 35
Exopeptidasa, 378, 1097
Expansión de tripletes, 193, 193 – 194, 193f
Expresión génica, 235
coordinada, 333
eucariotas, 347 – 360
complejo de preiniciación, 350 – 357, 351f, 352f
metilación del DNA, 340f, 349 – 350, 349f
regulación, 357 – 360
unión de histonas al DNA, 347 – 349, 348f, 349f
foránea, en células transfectadas, 312, 312f
regulación, 329 – 360
Extinción molar, coeficiente de, 151
Extintor, 151
Extremo 3′, 34
Extremo 5′, 34
F_1/F_0 ATPasa, 579
F_{ab}, fragmento, 375, 375f
F_c, fragmento, 375, 375f
Fabry, enfermedad de, 683ap, 763t
Factor anti-asociación, 246
Factor atrionatriurético
orígenes, 914t
receptor del. *Véase* Receptor del factor atrionatriurético
síntesis, 970
Factor C de replicación, 175
Factor de activación plaquetario, 730, 730f
Factor de carga de la abrazadera, 175
Factor de crecimiento epidérmico, 1031, 1031 – 1032
acciones, 914t
orígenes, 914t
Factor de intercambio de nucleótidos de guanina eIF-2b, 246
Factor de la necrosis tumoral, 23ap, 886, 892, 893ap, 953
Factor de liberación, 251
Factor de tolerancia a la glucosa, 1163
Factor de von Willebrand, 1037
Factor estricto, 345
Factor extrínseco, 1156
Factor G, 251
Factor general de transcripción, 350
Factor III, 1033, 1035. *Véase también* Factor tisular
Factor inhibidor de la liberación de gonadotropina, 910t
Factor inhibidor de la liberación de prolactina, 910t, 913t
Factor liberador de prolactina, 910t, 913t
Factor tisular, 1033, 1033 – 1034, 1035
inhibidor de la ruta del, 1041, 1044f
Factor V, 1036, 1039f
Factor Va, activación, 1043 – 1045, 1044f
Factor VII, 1033, 1035
Factor VIII, 1037, 1037 – 1038
Factor VIIIa, 1035
activación, 1043 – 1045, 1044f
Factor XIII, 1038, 1039f
Factor XIIIa, 1035, 1035 – 1036
Factor IX, 1035
Factor X, 1035
Factor XI, 1035
Factores de coagulación
activación, 1146
factor III, 1033, 1035
factor V, 1036, 1039f
factor Va, activación, 1043 – 1045, 1044f
factor VII, 1033, 1035
factor VIII, 1037, 1037 – 1038
factor VIIIa, 1035
activación, 1043 – 1045, 1044f
factor XIII, 1038, 1039f
factor XIIIa, 1035, 1035 – 1036
factor IX, 1035
factor XI, 1035
papel de los residuos Gla en la, 1045 – 1046, 1046f
Factores de elongación, 246
de la traducción, 343
factor 2, ribosómico, 250
Factores de crecimiento similares a la insulina
acciones, 913t
fuentes, 913t
IGF-I, 893 – 894
Factores de iniciación, 245, 245 – 246, 247f
factor 2a, 246

Factores de transcripción, 347, 350 – 351, 977 – 978
  enfermedad cardiovascular, 359ap
  eucarióticos, 354
  generales, 347, 350 – 351
  regulación, 358
Factores de verificación, 180
Factores **σ**, 210, 219, 220f
FAD. *Véase* Flavina adenina dinucleótido
Fagocitosis, 20, 21f
Fagos. *Véase* Bacteriófago(s)
Familias de proteínas, 367 – 409
Fármaco(s). *Véase también* fármacos específicos y tipos de fármacos
  anticoagulantes, 685ap
  administración de, liposomas para la, 504ap
  como inhibidores enzimáticos, 434 – 436
  destoxificación, 603
  efectos adversos, 481ap
  eliminación de la sangre, 420
  topoisomerasas como dianas, 175ap
Farnesil pirofosfato, síntesis, 744 – 745, 744f
Fase G2, 178
Fase M, 178
Fase S, 178
F_{ab}, fragmento, 375, 375f
FEN1, 175, 176f, 177
Fenformina, y acidosis láctica, 621ap
Fenilacetilglutamina, 790, 790f
Fenilalanina, 95, 797 – 803
  cadenas laterales, interacciones hidrofóbicas entre, 136f
  degradación, 797 – 803
  niveles altos, 799ap
  productos, 799f
Fenilalanina hidroxilasa, 797, 798f, 881
Fenilcetonuria, 146ap, 799ap, 882
Feniletanolamina *N*-metiltransferasa, 919, 921f
Fenobarbital, 483
  y requerimientos de vitaminas, 1148ap
Fermentación, 599
Fermentación bacteriana, 898 – 899, 899f
Ferredoxinas, 1056, 1056, 1056f
Ferritina, 1056
Ferroquelatasa, 1070
Ferrosulfuradas. *Véase* Proteínas ferrosulfuradas
Ferrosulfurados, síntesis de grupos, 1057ap
Ferroxidasa I/II, 1061
Feto, 891
  requerimientos nutricionales, 891
Fibra de la dieta, 1082, 1127 – 1128
  destinos metabólicos, 1127 – 1128
  fuentes, 1127 – 1128
  hidrosolubles, 1127 – 1128, 1127t
  ingestión, 1127 – 1128, 1131
  mucilaginosas, 1127, 1127t
  propiedades, 1127 – 1128, 1127t
  tipos, 1127 – 1128, 1127t
Fibras de 30 nm, 67, 67f
Fibrina
  formación en el infarto de miocardio, 378ap
Fibrinógeno, 1035, 1038f
Fibrinólisis, fase de la coagulación sanguínea, 1031, 1045, 1045f
Fibrosis quística, 256ap, 273, 1093ap
  canal de cloruro en la, 516, 518ap
  consideraciones nutricionales para la, 1142ap
Fick, primera ley de la difusión, 512
Fiebre, prostaglandinas y, 770
Fijación de oxígeno, 395 – 402, 514f. *Véase también* Efecto Bohr
Filamentos delgados, 1018
Filamentos gruesos, 1018 – 1021, 1020f, 1021f
Fischer, fórmulas de proyección de, 1173
Flavina, coenzimas, espectro de absorción, 455f
Flavina adenina dinucleótido, 427, 428f, 468, 549, 850 – 852, 1150 – 1151
  función coenzimática, en la reacción de la succinato deshidrogenasa, 427, 428f
  propiedades ópticas, 453 – 455
  síntesis, 851f
Flavina mononucleótido, 427, 428f, 468, 567, 567 – 568, 567f, 1150 – 1151
Flavoproteínas, 567
Flipasa, 509
Flopasa, 509
Fluconazol, 480
Fluidez
  de membrana, 509 – 510
    anormalidades, 510ap
    factores que afectan a la, 510 – 511, 510ap
  de membrana plasmática, colesterol y, 510ap
Fluidos, secreción por el epitelio intestinal, 1092 – 1093, 1092f
Fluidos biológicos, 9
Fluidos corporales, 873t
Flujo de sodio electrogénico, 1090 – 1091, 1091f
Flujo electroosmótico, 142f
5-Fluoro-2′-desoxiuridina 5′-monofosfato (FdUMP), 854
Fluoróforo, 151
5-Fluorouracilo (Fura), 854, 854f
Fluorouracilo, 436
Fluoruro, 613, 1164
  inhibición de la glucólisis por, 613, 613f
fMet-RNA, 246
$fMET\text{-}tRNA_i^{met}$, 252
FMN. *Véase* Flavina mononucleótido
Forbol, ésteres de, 654, 655
Formas resonantes, 543, 545f
Formas tautoméricas, 37, 37 – 38, 37f
N^{10}-Formil H_4folato, 830, 832f
Formiminoglutamato, 816, 817
Fórmulas de Haworth, 1173
Fórmulas de proyección de Fischer, 1173
Fosfacán, 688
Fosfatasa alcalina, 1085t
Fosfatasas, 20t, 418, 451f
Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, 659, 659f, 732, 732f, 930
Fosfatidilcolina, 496, 496f, 1177
  ácidos grasos en, 497
  carga sobre, 498t
  síntesis, 736 – 737, 736f, 737f
Fosfatidiletanolamina, 496, 496f, 1177
  ácidos grasos en, 497
  carga sobre, 498t
  síntesis, 737, 737f, 738f
Fosfatidilglicerol, 498t, 729 – 730, 730f
Fosfatidilglicerol fosfoglicérido, 496, 496f. *Véase también* Difosfatidilglicerol
Fosfatidilinositol, 497, 497f, 729, 730f, 1177
  anclaje de glucoproteína a la membrana plasmática, 733 – 734, 734f
  carga sobre, 498t
  ciclo del, 967
  en el anclaje de proteínas a las membranas, 507, 507f
  ruta del, 948 – 950, 948t
  síntesis, 738, 738f
Fosfato, nivel estacionario, 424
Fosfato translocasa, 584
Fosfoacilgliceroles, 1175, 1176
3′-Fosfoadenosina 5′-fosfosulfato, 687, 687f, 808, 808f
Fosfoanhídrido, 539
Fosfocreatina, 890
Fosfodiesterasa, 1010, 1012
Fosfo*enol*piruvato, 558, 633f
  sistema de fosfotransferasa dependiente del, 527
Fosfo*enol*piruvato carboxiquinasa, 631 – 633, 632f, 642f, 643, 884
6-Fosfofructo-1-quinasa, 605, 614
  aspectos reguladores, 614, 615f
  control hormonal, 622 – 624
  en la glucólisis, 618 – 622
  regulación, 618 – 622
6-Fosfofructo-2-quinasa, 623
  isozima cardíaco, 628f
  isozima hepático, 626f
  modificación covalente, 625f
  naturaleza bifuncional, 623, 624, 626
Fosfoglicerato mutasa, 418, 607
Fosfoglicerato quinasa, 607
Fosfogliceratos, interconversión, 418f
Fosfoglucoisomerasa, 605, 633
Fosfoglucomutasa, 646, 672
Fosfoglicéridos. *Véase* Glicerofosfolípidos
6-Fosfogluconato, ruta. *Véase* Ruta de las pentosas fosfato
6-Fosfogluconato deshidrogenasa, 668
6-Fosfoglucono-δ-lactona, formación, 666 – 668, 667f
Fosfoglucoquinasa, 646
Fosfoguanidinas, 544t
4-Fosfoinositol glicerofosfolípidos, 497
Fosfolipasas, 1105
  A_1, 738, 739f
  A_2, 738 – 739, 739f, 1105, 1106f
  C, 659, 659f, 928 – 931, 930f, 1086
Fosfolípidos, 494, 728 – 740, 728f
  distribución asimétrica de ácidos grasos en los, 738 – 740, 739f, 740f
  estructura, 729 – 730, 729f, 730f
  funciones, 730 – 734
    en el anclaje de glucoproteínas a la membrana plasmática, 733 – 734, 734f
    en la función pulmonar, 730 – 732, 731f
    en la transducción de señales, 732 – 733, 732f, 733f
  glicerol éter, 498, 498f
  grupos acil grasos en, conformación, 497f, 498
  hidrólisis, 1105
  interacciones en medios acuosos, 502, 503f
  síntesis, 734 – 738
Fosfomanosa isomerasa, 672
Fosfopentosa epimerasa, 668
Fosfoproteína fosfatasa, 551, 626, 652, 653, 655, 656, 656f, 880
Fosforilación, 271, 613f, 672, 880f, 881f
  a nivel de sustrato, 607, 609
  autofosforilación, 944
  de proteínas, 943 – 944, 944 – 945, 945f
  enzimas, 624, 624f, 880f, 881f
Fosforilación oxidativa, 539, 577 – 582, 577f
  acoplamiento de la síntesis de ATP y transporte electrónico, 577 – 579, 578f
    desacopladores e inhibidores, 578 – 579, 578f, 579f
  ATP sintasa, 579 – 582, 579f, 580f, 580t
    estudios estructurales, 581 – 582, 582f
    síntesis de ATP sobre la superficie de F_1, 580 – 581, 581f
  desacopladores e inhibidores, 578 – 579, 578f, 579f
  razón P/O, 578
Fosforilasa *a* en el hígado, 657 – 658
Fosforilasa quinasa, 652
Fosforólisis, 644 – 648, 1171
5-Fosforribosilamina, 830

Fosforribosilpirofosfato, 423ap, 833, 835, 835f, 853 – 854, 853f
Fosforribosilpirofosfato sintetasa, 423ap, 437ap
Fotofobia, 801ap
Fotoliasa, 199, 199 – 200
Fotorreactivación, 199, 199 – 200, 200f
Fototerapia, para la hiperbilirrubinemia neonatal, 1074ap
Fourier, síntesis de, 149
Fóvea central, 1005
Fragilidad capilar, 1158
Fragmento F_{ab}, 375, 375f
Fragmento F_c, 375, 375f
Fragmento Klenow, 284
Fragmentos de Okazaki, 166
Frataxina, 1057ap
Frenosina, 499
Friedreich, ataxia de, 1057ap
Fructólisis, 637
Fructoquinasa, deficiencia de, 673ap
Fructosa 1,6-bisfosfatasa, 619, 633, 633f
Fructosa 1-fosfato, 617, 637
Fructosa 1-fosfato aldolasa, 672
  deficiencia, 673ap
Fructosa 2,6-bisfosfatasa, 881
  concentración celular, 625f, 626
  isozima cardíaco, 628f
  isozima hepático, 626f
  modificación covalente, 625f
  naturaleza bifuncional, 623, 624, 626
Fructosa 2,6-bisfosfato, 618, 622 – 624, 623f, 641 – 642
  degradación, 623f
  estructura, 622f
  formación, 623f
Fructosa 4-fosfato, formación, 669 – 670
Fructosa, 616, 617, 1005
  estructura, 1101t, 1172
  formación, 638f
  fuentes, 1101t
  gluconeogénesis a partir de, 637, 638f
  intolerancia a la, 616ap, 673ap
  malabsorción, 529ap
  transporte, en células de mamíferos, 528t
Fructosuria esencial, 673ap
FSH. *Véase* Hormona estimuladora del folículo
Fucosidosis, 683ap, 763t
Fuerza controladora, 614
Fuerza electromotriz, 564
Fuerza protón motriz, 577
Fuerzas de dispersión de London, 137 – 138, 138f
Fuerzas de van der Waals, 137 – 138, 138f, 1172
Fuerzas iónicas, estabilidad de la doble hélice del DNA, 41 – 42
Fumar, efectos sobre los niveles séricos de vitamina C, 1158
Fumarasa, 418, 418f, 557
  deficiencia, 557ap
Fumarato, 788, 789f, 798 – 799
Furanosa, anillo de, 1173
Furosemida, 1093, 1093f
G, subunidad, 655 – 656, 656f
G2, fase, 178
G6P. *Véase* Glucosa-6-fosfato
GABA. *Véase* Ácido γ-aminobutírico
Galactitol, 674ap
Galactocerebrósidos, 499, 758, 758f, 759, 759f
  estructura, 498 – 499, 500f
  distribución, 499
Galactolípidos. *Véase* Galactocerebrósidos
Galactoquinasa, deficiencia de, 674ap
Galactosa 1-fosfato, acumulación, 674ap
Galactosa 1-fosfato uridililtransferasa, 638
  deficiencia, 674ap
Galactosa, 638
  estructura, 1172
  gluconeogénesis a partir de, 638, 639f
  interconversión, 673 – 674, 673f, 674ap
  y grupos sanguíneos, 678
Galactosemia, 638, 674ap
β-Galactosidasa, 330, 1102, 1103t
  síntesis, deficiencia, en *E. coli*, 337 – 338, 337f
Gangliósidos, 499, 760 – 761, 760f, 761f, 1177
Gangliosidosis, 763t
  GM_1, 683ap
  GM_2, variante O, 683ap
Gastrina, 1087
  acciones, 914t
  como secretagogo, 1086t, 1087
  estructura, 1087, 1088t
  orígenes, 914t
Gastrina hipotalámica, péptido liberador de, 910t
Gaucher, enfermedad de, 683ap, 763t
  diagnóstico, 765ap
  terapia génica, 320ap
Gen de la dihidrofolato reductasa como marcador para la selección de células transfectadas, 311
Gen de la obesidad, 1124
Gen(es). *Véase también* DNA; Expresión génica
  anotación en la secuenciación, 324
  duplicación, 376
  estructurales, 331
  genoteca, 291
  indicador, 313 – 314
  mutaciones, 454ap. *Véase también* Mutaciones
  protooncogenes, 979 – 982
  reguladores, 331
  resistencia multifármacos asociada, 525
  silenciadores, 979
  terapia, 191ap, 319, 320ap
Genética inversa, 318
Genética molecular, hemocromatosis tipo I y, 1062ap
Genoma
  circular, terminación de la replicación, 181
  lineal, terminación de la replicación, 181 – 183, 181f
  medicina genómica, 186ap
  Proyecto Genoma Humano, 185ap
  RNA, replicación, 183 – 184
  secuenciación, 323 – 324
Genosuprimido, ratón, 321
Genoteca de bacteriófagos, 305 – 306, 306f
Gentamicinas, inhibición de la síntesis de proteínas, 254, 254 – 255
Gilbert, síndrome de, 1075ap
Girasa inversa, 66, 66t
Girasas, 65
  inversas, 66, 66t
Gla. *Véase* γ-Carboxiglutamato, residuos
Glándula mamaria, 705 – 706
Glándula suprarrenal, síntesis de hormonas esteroides en la, 964
Glándula tiroides, metabolismo del yodo y, 1162
Glándulas salivales, funciones, 1083f, 1084
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, 606
Gliceraldehído, estructura, 1171
Gliceraldehído-3-fosfato, 433f, 669 – 670
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
  e inhibición acompetitiva, 433, 433f
  inactivación, 613, 613f
  mecanismo de acción, 607f
  reacciones catalizadas por, 606
Glicerofosfolípido de colina. *Véase* Fosfatidilcolina
Glicerofosfolípido de etanolamina, 496. *Véase* Fosfatidiletanolamina
Glicerofosfolípidos, 494, 495
  ácidos grasos en, 497, 497t
  anfipáticos, 498
  carga sobre, 498 – 499, 498t
  estructura, 495 – 496, 495f
L-Glicerol 3-fosfato, estructura, 495f
Glicerol 3-fosfato, 707 – 708, 707f
Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, 569, 569f, 611
Glicerol, gluconeogénesis a partir del, 637, 637f, 866 – 869
Glicerol éter fosfolípidos, 497f, 498
Glicerol fosfato, lanzadera del, 584, 585f, 610 – 611, 610f
Glicerol quinasa, 443, 637
Glicina, 95, 794, 795ap, 1105
  complejo de rotura de la, 794, 795f
  en la síntesis de hemo, 1067
  oxidación, 794, 795f
  receptores de, 993
  síntesis, 1154
  deficiencia, 795ap
Glicoaldehído, activo, 668
Glicoforina, 506
N-Glicosilación cotraduccional, 260
Glioxalato, 794
Globósidos, 759 – 760, 759f, 1177
Globulina de fijación
  de corticosteroide, 974
  de hormonas sexuales, 974
α_2-Globulinas, 967, 1076
Glóbulo fundido, estado, 133
Glóbulos blancos. *Véase* Leucocitos
Glóbulos rojos. *Véase* Eritrocitos
Glositis, 1148
Glucagón, 600, 624, 869
  acciones, 625f, 626, 641, 642, 642f, 653, 658, 914t
  orígenes, 914t
  receptores de, 626
  síntesis, 623
Glucano, 507
1,4-α-Glucano, enzima ramificante de, 650
Glúcido(s), 1171. *Véase también* Almidón; Azúcar(es)
  complejos, biosíntesis, 678 – 679
  contenido energetico de los de (kcal), 1118
  efecto de inducción del sueño, 811
  en glucoproteínas, 679 – 680
  marcador de destinación lisosómica, 682ap
  síndromes de glucoproteína debidos a deficiencia, 672ap
  uniones
    con glucoproteínas, 680 – 681f
    con proteína, 131 – 132, 132f
Glúcidos de la dieta, 1082 – 1083, 1101t, 1125
  absorción, 1100 – 1103, 1102f
  contribución al suministro diario de nutrientes, 1082, 1082t
  destinos metabólicos, 1125
  digestión, 1100 – 1103, 1102f
  ingestión, 1082t
    y ahorro proteico, 1122
    y depósitos de glucógeno, 1125, 1125ap
    y diabetes mellitus, 1126ap
    y resistencia atlética, 1125ap
    y triacilgliceroles séricos, 1129, 1130ap
  refinados, ingestión, 1129
Glúcidos de membranas, 502, 502f
Glucoamilasa, 1085t, 1103t
Glucocerebrosidasa, deficiencia en la enfermedad de Gaucher, 320ap
Glucocerebrósidos, 499, 758 – 759, 758f, 759f
Glucoconugados, 665 – 688, 1107, 1107t, 1111

Glucocorticoide(s), 960, 977, 1178
  elementos de respuesta a, 977, 977t
  receptor de, 977
  supresión de la respuesta inflamatoria por, 978f
  supresión de la respuesta inmunitaria por, 978f
Glucoesfingolípidos, 499, 756, 758 – 761, 1177
  cerebrósidos, 758 – 759, 758f, 759f
  gangliósidos, 760 – 761, 760f, 761f
  globósidos, 759 – 760, 759f
  sulfátido, 759, 759f
Glucogénicos, aminoácidos, 634 – 636, 636t, 781
Glucogenina, 652, 652f
Glucógeno, 600, 646f, 1100, 1175
  almacenamiento, 643, 1125
    de glucosa como, 651
    e ingestión de glúcidos, 1125, 1125ap
    y comidas, 643, 643f
  digestión y absorción de, 1100 – 1102, 1102f
  enfermedades de almacenamiento de, 647, 647ap, 649
  enzima desramificante del, 648 – 649, 648f
  enzima ramificante de, 650, 650f
  metabolismo, control por efector del, 656
  síntesis
    cebador para la, 651, 652f
    control por retroinhibición de la, 657
    enzimas para la, 649 – 650, 649f
    regulación, 652, 657
Glucógeno fosforilasa, 644 – 648, 648, 652 – 653, 653f, 881
Glucógeno sintasa, 649 – 651, 650, 652, 654 – 655, 655f
Glucogenogénesis, 598, 643 – 661
Glucogenólisis, 598, 629, 643 – 661, 646f, 652, 657f, 658 – 659, 658f
Glucogenólisis hepática, 865 – 866
Glucolípidos, enfermedades de, 683ap
Glucólisis, 547, 598, 599f, 603 – 614, 991
  ecuación global de la, 599f
  excesiva, 621ap
  fase de oxidorreducción-fosforilación, 603, 606 – 609
  fase de partición, 603, 605
  fase de preparación, 603, 605
  fases, 603 – 609, 604f
  fluoruro y, 613, 613f
  inhibición, 613 – 614
  reactivos de grupo sulfhidrilo y, 613, 613f
  regulación, 614 – 629
  rendimiento en ATP y, 609
  y ruta de las pentosas fosfato, 666
    unión reversible entre, 668
Glucólisis anaeróbica, 609
  ATP para la retina, 1005 – 1006
  rendimiento en ATP y, 609
Gluconeogénesis, 558, 603, 629 – 643, 629ap, 866 – 869
  a partir de
    ácidos grasos, 636 – 637
    alanina, 634 – 636, 635f
    azúcares, 637 – 638, 638f, 639f
    la cadena carbonada de aminoácidos, 634 – 636, 635f
    lactato, 631 – 632, 632f
  enzimas glucolíticos en la, 633
  ingestión de etanol y, 641 – 642, 643ap
  propionato y, 637f
  puntos de regulación, 639 – 641, 640f
  regulación hormonal, 641 – 642
  ruta abreviada, 629f
  síntesis de urea y, 634 – 636, 635f
  y gasto de ATP, 638 – 639
D-Glucono-5-lactona, 1174
Glucoproteínas, 502, 679 – 682
  con enlaces *N*, síntesis, 681 – 682
  estructura, 680 – 681f
  funciones, 679
  glúcidos en las, 679 – 680
  heterogeneidad, 261, 261f
  microheterogeneidad, 680
  síndromes deficiente en glúcidos, 672ap
  síntesis, 1140
  y glúcido unido covalentemente, 129 – 132
Glucoproteínas P, 525
Glucoquinasa, 426, 615 – 618, 617, 617f
  curva de saturación de sustrato para la, 616f
  especificidad, 440
  reacción catalizada por la, 426, 614
Glucosa
  absorción epitelial, 1095, 1095f
  activada, 649
  almacenamiento, 651
  catálisis, 455
  conformaciones, 441, 442f
  estructura, 1101t, 1172
  factor de tolerancia a la, 1163
  fuentes de la dieta, 1101t
  homeostasis, 875, 876f
  interconversión a galactosa, 673 – 674, 673f
  intolerancia, 885
  malabsorción, 529ap
  metabolismo, 600 – 603, 600f – 601f
    en el estado temprano de renutrición, 869 – 870, 870f
    glucólisis y, 599f
  requerimiento del cerebro de, 990 – 991
  sanguínea (sérica)
    e índice glucémico de alimentos, 1130t
    factores que afectan a, 1129
    fuente, 865 – 866
    nivel estacionario, 423
  síntesis. *Véase* Gluconeogénesis
  transporte, 520, 520f, 528t
  transporte dependiente de sodio, 526, 526f
  transporte transepitelial, 1094, 1095f
  UDP-, 638
    oxidación, 611, 674 – 675, 674f
    síntesis, 673
  utilización en el estado de buena nutrición, 864f
  y rutas del metabolismo glucídico, 598f
Glucosa 1-fosfato uridililtransferasa, 649
Glucosa 6-fosfatasa, 605, 617, 617f, 646, 884
  deficiencia, en la enfermedad de von Gierke, 834ap
  reacciones catalizadas por, 605, 633f, 634f
Glucosa 6-fosfato, 455, 634f
  deshidrogenación, 666 – 668, 667f
  en la ruta de las pentosas fosfato, 666 – 668
  oxidación completa, 670 – 671, 670f
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 667 – 668
  deficiencia, 668ap
D-Glucosa, transporte a través de membrana, 526, 526f
Glucosa activada, 649
Glucosa deshidrogenasa, UDP-, 674 – 675
Glucosamina 6-fosfato, síntesis, 675 – 677
Glucosaminoglucanos, 683 – 684, 685f, 688
  cadenas de, unidades repetitivas, 685f
α-Glucosidasa, 1102. *Véase también* Maltasa
β-Glucosidasa, 1085t, 1103t
Glucosidasas, 260, 649, 687 – 688
  defectos de, 683ap, 685ap
β-*N*-Glucosídico, enlace, 828
N-Glucosídicos, enlaces, 131, 132f, 258, 258 – 259
Glucosilación
  cotraduccional, 260
  mediante enlace *N*, 131, 132f, 258, 258 – 259
  mediante enlace *O*, 132, 132f
  proteínas, 257, 257 – 261, 258t, 259f – 261f
N-Glucosilación, 131, 132f, 258, 258 – 259
N-Glucosilación cotraduccional, 260
O-Glucosilación, 132, 132f, 260 – 261
Glucosilasa, 194, 194f
Glucosilceramida, estructura, 1177
Glucosil-fosfatidilinositol, anclas de, 507, 507f, 507t, 733 – 734, 734f
Glucosilos, dador de, 1140
Glucosiltransferasas, 257, 257 – 258, 258t, 678 – 679
β-Glucuronidasa, deficiencia de, 688ap
Glucurónidos, 611 – 612
GLUT. *Véase* Transportadores de glucosa
GLUT-3, 602
GLUT-4, 602
Glutamato, 97, 103f, 104f
  cadenas laterales, 97f
  conversión de ornitina en, 871
  en la síntesis de aminoácidos, 784, 784f, 790 – 792
  transporte, en células de mamíferos, 528t
Glutamato deshidrogenasa, 784, 784f, 785, 787
Glutamato-piruvato aminotransferasa, reacción de la, 782f
γ-Glutamilcisteinilglicina. *Véase* Glutatión
γ-Glutamilo, ciclo del, 527, 527f, 819, 820f
γ-Glutamiltransferasa, 1085t
γ-Glutamiltranspeptidasa, 527, 819
Glutamina, 97, 784
  antagonistas, 856 – 857, 856f
  catabolismo, 868f
  ciclo de la, 785, 785f, 893 – 894, 897 – 898, 898f
  ciclo intercelular de la, 785, 785f
  en el equilibrio ácido-base, 896 – 898
  en la producción de amoníaco, 784 – 785
Glutamina PRPP-amidotransferasa, 833, 833f, 835
Glutamina sintetasa, 784, 785f
Glutaminasa, 784, 785f, 885
Glutaminólisis, 867
Glutarredoxina, 844
Glutatión, 527, 527f, 602, 602f, 818 – 820, 872
  composición, 790 – 791
  fármacos conjugados por, 818 – 819, 819f
  producción, 872f
  síntesis, 819, 820f
Glutatión peroxidasa, 592, 592f, 794, 1163
Glutatión reductasa, 592, 844, 1003
Glutatión transferasa, 479
Glutatión transhidrogenasa, 924
Gluten, 1084
GMP. *Véase* Guanosina 5′-monofosfato
GMP reductasa, 835
GMP cíclico. *Véase* cGMP
GnRH. *Véase* Hormona liberadora de gonadotropina
  péptido asociado a la, 918
Gobina, producción de cadenas, cambios relacionados con la edad, 393f
Golgi, complejo, 18
Golpe de potencia
Gomas, 1127, 1127t
Gonadotropas, 934, 971
Gonadotropina
  acciones, 913t, 932 – 936, 933f, 948 – 950, 948t
  estructura, 923t
  factor inhibidor de la liberación de, 910t

gen, 918
hormona liberadora de, 910t, 971
orígenes, 913t
secreción, 971 – 972
Gonadotropina coriónica, 913t, 936
Gota, 437ap, 826, 834, 834ap, 854
Gradiente de protones y carga, 577, 577f
Gráfica de Lineweaver-Burk, 424, 424f
Gramicidina A, 529t, 530, 530f
Gránulos cromafines, 919
Gránulos de zimógeno, 1085
Grasa(s), 1176
almacenamiento de, 651
malabsorción de, 1144
prevención de la absorción de, 1106ap
y deficiencia de vitamina K, 1147
Grasas de la dieta, 1126 – 1127. *Véase también* Lípido(s)
contenido energético de las (kcal), 1118
contribución al suministro diario de nutrientes, 1082, 1082t
ingestión, 1082t, 1104
exceso, 1126 – 1127
inadecuada, 1126 – 1127
y ahorro de proteínas, 1122
y diabetes mellitus, 1126ap
y riesgo de cáncer, 1126 – 1127
Grupo prostético, 395, 414
Grupo prostético piruvilo, formación de un enzima con, 795f
Grupo sanguíneo, determinación de azúcares, 678, 679ap
Grupos amino, transferencia de, 782, 782f
Grupos carboxilo, 695 – 697
Grupos ferrosulfurados, 469
síntesis de, 1057ap
Grupos funcionales, 1170
Grupos metileno, 696
GTF. *Véase* Factor de tolerancia a la glucosa
GTP. *Véase* Guanosina trifosfato
GTP, proteínas de unión a, 997
Guanilato ciclasa, 950, 950f, 1012, 1086
Guanilina, 1086t, 1087, 1088t, 1094ap
Guanilo ciclasa, 1086
Guanina, 29, 29f, 828
Guanosina 5′-monofosfato, 830
síntesis, 832f, 833
Guanosina, 30, 30f
Guanosina pentafosfato, síntesis, 345
Guanosina tetrafosfato, síntesis, 345
Guanosina trifosfato, 826 – 827, 837, 837f, 838
Gustina, 1162
H_2O_2, eliminación por la catalasa, 722 – 723
Halotano, e hipertermia maligna, 621ap
Hapteno, 369
Haptoglobinas, 1075
Hartnup, enfermedad de, 529ap, 1100ap
Haworth, fórmulas de, 1173
HCl, secreción, 1096, 1096f
Hebra conductora (o continua), 166
Helicasas, 169, 178, 353
Hélice de poliprolina tipo II, 123
Hélice de reconocimiento, 388
Hélice plectonémica, 63, 63f
Hélice α, 114 – 115, 114f, 126f, 151f
Hélice-giro-hélice, proteínas, 354, 355f, 387, 388f, 979
Hélice-lazo-hélice, proteínas, 357, 357f
unión de calcio, 524, 525f
Hematina, 1054
Hemiacetales, 1170
Hemiacetales cíclicos, 1172
Hemicetales, 1172
Hemicelulosa, 1127, 1127t
Hemo, 395
catabolismo, 1071 – 1076, 1072f
entorno, movimiento de residuos en el, 402f
estructura, 395 – 396, 395f, 1063, 1063f
metabolismo, 1063 – 1076
síntesis, 1063 – 1071
enzimas en la, 1065 – 1070
etapa limitante de la, ALA sintasa en la 1070 – 1071
rutas, 1063, 1064f
Hemocromatosis, 1162
idiopática, 1061
tipo I
genética molecular, 1062ap
y dietas ricas en hierro, 1062ap
tipo II, 1063ap
Hemocromatosis idiopática, 1062
Hemofilia
B, diagnóstico mediante secuenciación directa de DNA, 287ap
clásica, 1039ap
Hemoglobina, 368, 393
aspectos moleculares, 393 – 409
cadena β, comparación con la mioglobina, 398f
gráficas de Hill para la, 399f
cambios inducidos por el oxígeno en la, 439
cisteína 93 de las cadenas β (βCys^{93}) y, 407 – 408, 408f, 409f
CO_2 y, 403
curva de saturación de oxígeno y, 403 – 404, 404f, 407f
estructura, 393 – 409, 395f, 401f, 402f
fetal, persistencia hereditaria de la, 54ap
fijación de oxígeno, 395 – 396, 399 – 402, 399f
glucosilada, 132ap
humana, cadenas según el estado de desarrollo, 394t
interfase β-β y, 406 – 407, 407f
modulador de oxígeno 2,3-bisfosfoglicerato(BPG) y, 406, 406 – 407, 406f, 407f
modulador de oxígeno 2,3-difosfoglicerato(DPG) y, 406, 406 – 407, 406f, 407f
mutaciones de cambio de sentido, 238ap
mutaciones y, 394ap
pared de los capilares y, 407 – 408
S, y anemia falsiforme, 112ap
secuencia de aminoácidos, 397t
tipos, 394, 394t
transporte en forma carbamino, 405, 406f
y descarga de O_2, 407 – 408, 408f, 409f
y hemólisis intravascular, 1074 – 1076
y NO, 403, 407 – 408, 408f, 409f
Hemoglobinopatías, 394ap
Hemólisis intravascular, recuperación del hierro con, 1074 – 1076
Hemólisis isoinmune neonatal, 1074ap
Hemooxigenasa, 1071
Hemopexina, 1076
Hemoproteínas, 466
Hemosiderina, 1056
Hemostasis. *Véase* Coagulación sanguínea
Henderson-Hasselbalch, ecuación, 11, 11 – 12, 13ap, 102 – 103, 102f
Heparán sulfamidasa, deficiencia de, 688ap
Heparán sulfato, 685
Heparina, 684 – 685
actividad anticoagulante, 685ap
estructura, 685f
proteína que une, 1040, 1040 – 1041
Hepatocitos
periportales, 897, 898f
perivenosos, 897, 898f
Heptosa, formación, 668, 669f
HER-2/neu, oncogén, 953
Heridas, efectos metabólicos, 892
Herpesvirus, 854, 857
herpes símplex, tipo I, glucoproteína D, mutagénesis dirigida, 315ap
Heterodímeros, 976
Heterofagia. *Véase* Fagocitosis
Heterogeneidad, glucoproteínas, 261, 261f
HETEs. *Véase* Ácidos hidroxiicosatetraenoicos
Hexoquinasa(s), 423, 441, 604f, 605, 614
aspectos reguladores, 614, 615f
cambio conformacional inducido por la glucosa, 442f
con enlace de glucosa, 118f
curva de saturación de sustrato para la, 616f
especificidad, 440
forma sin ligando, 118f
propiedades, 615 – 618, 616ap
reacción catalizada por, 613f
Hexosa(s), 668, 669f, 672f
Hialuronato, 684, 685f
Hibridación, DNA, 44
Hibridación *in situ*, 301
Hidratación, 713
Hidrocarburos arílicos, receptor de, 477, 980
Hidrofobicidad, 106, 108f
Hidrólisis, 709, 1171
energía liberada en la, clasificación de compuestos, 543, 544t, 545, 545f
energía libre de, determinación, 545
Hidrólisis parcial, 147
Hidroxi metilglutaril CoA, 720, 811 – 812
en la síntesis de acetoacetato, 720
síntesis de colesterol, 743, 743f, 750 – 751
Hidroxi metilglutaril-CoA reductasa, síntesis de colesterol, 743, 743f
Hidroxi metilglutaril-CoA sintasa, 722
25-Hidroxi vitamina D_3 (25-hidroxicolecalciferol), 972, 972 – 973, 1142
Hidroxiácido graso, formación, 705
α-Hidroxiácidos grasos, 705
3-L-Hidroxiacil CoA, 714
β-Hidroxibutirato, 547, 712, 712f, 720 – 722
β-Hidroxibutirato deshidrogenasa, 507
11β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa, 977
p-Hidroxifenilpiruvato oxidasa, 798
Hidroxiindol-*O*-metiltransferasa, 932
Hidroxilación, 467, 471
Hidroxilación cotraduccional, 268
11β-Hidroxilasa, en la síntesis de esteroides, 964
17-Hidroxilasa, en la síntesis de esteroides, 964
21-Hidroxilasa, en la síntesis de esteroides, 964
5-Hidroxilisina, 680, 682f
17α-Hidroxipregnenolona, 474
síntesis, 474
17α-Hidroxiprogesterona, 474
síntesis, 474
Hidroxiprolina, 792, 792f
síntesis, 271ap
5-Hudroxitriptamina. *Véase* Serotonina
5-Hidroxitriptófano, 1001, 1001f
Hidroxiurea, 856 – 857, 857f
25-Hidroxivitamina D, 475
Hierro
absorción, 1058ap, 1058f, 1059, 1158
duodenal, 1058ap
intestinal, 1058f, 1059
almacenamiento, 1056
asignación dietética recomendada, 1161
bioquímica, 1054

deficiencia de, 1057, 1062ap, 1161 – 1162
distribución, 1061 – 1063, 1061t
elementos de respuesta al, 272, 1059, 1059 – 1060, 1059f, 1060t
mutaciones, 1060ap
estados de oxidación, 1054
excreción, 1057
hemo, 430. *Véase también* Hemo
iones férricos, 1055
iones ferrosos, 1055
metabolismo, 1054 – 1063, 1061 – 1063, 1161, 1161f
no hemo, 556
papeles fisiológicos del, 1161
recuperación, con hemolisis intravascular, 1074 – 1076
requerimientos en el neonato, 1147ap
sobrecarga (exceso), 1057, 1162
e infección, 1055ap
transferencia, 1054
transporte en el suero, 1054 – 1055
unión
a transferrina, 1054 – 1055
en la leche, 1055
utilización, regulación molecular de la, 1059 – 1060
Hígado, 603
ciclo de Cori en el, 891
ciclo intercelular de la glutamina, 897 – 898, 898f
cirrosis, 893 – 894
conjugación de bilirrubina en el, 1071 – 1074
daño, metabolismo de los aminoácidos y, 782
en el metabolismo de aminoácidos, 787, 788
en la diabetes mellitus dependiente de insulina, 889
en la diabetes mellitus tipo 1, 889
en la regulación del pH sanguíneo, 897 – 898
enfermedad hepática, desarreglos metabólicos causados por la, 893 – 894
fosforilación glucogénica de enzimas en el, 881f
fosforilación lipogénica de enzimas en el, 880f
fosforilasa a en el, 657 – 658
glucógeno en el, 643, 643f
gránulos, 644, 645f
glucogenólisis en la, 657f, 658 – 659
glucólisis en el, 623, 623f, 625f, 626, 627f
gluconeogénesis en el, 630f
inducción enzimática en el
durante el ayuno, 884f
en el estado bien nutrido, 883f
metabolismo, conmutación entre los estados de buena nutrición y de inanición, 876 – 885
oxidación del etanol en el, 895 – 896
reservas energéticas en el, 873t
toxicidad del paracetamol, 480ap
y glucosa de la dieta, 864
Hill
coeficiente (nH), 399t
ecuación de, 399
Hiperamonemia, 790ap
Hiperbilirrubinemia, 1074
herederitaria, 675ap
neonatal, 1074ap
Hipercolesterolemia, 694, 1163
tratamiento, 751ap
Hiperfagia, 709ap, 710ap
Hiperglicemia no cetótica, 795ap
Hiperhomocisteinemia, 805ap, 1151, 1155f
Hiperleucina-isoleucinemia, 813ap
Hiperlipidemias, 127ap, 711ap
Hiperlisinemia, 816ap
Hipermetilación, 350
Hiperplasia adrenal congénita, 474ap
lipoide, 964
Hiperpolarización, 994, 1008, 1011f
Hiperproinsulinemia familiar, 266ap
Hiperqueratosis folicular, en la deficiencia de vitamina A, 1141
Hiperquilomicronemia, 887 – 888
Hipersensibilidad a la DNasa I, 215
Hipersensibilidad, papel de los ácidos monohidroxi-icosatetraenoicos, 774
Hipertermia maligna, 621ap
Hipertensión, 984ap
Hipertermia maligna, 621ap
Hipertriacilglicerolemia, 617, 887 – 888, 887ap
Hiperuricemia, 836ap
Hipervalinemia, 813ap
Hipocromicidad, 42
Hipófisis
anterior
ensayo de la actividad, 910ap
formación de hormonas en la, 915 – 917, 917f
hormonas, 908, 909f, 913t
hormonas polipeptídicas de la, 910 – 912, 911f
hormonas trópicas, 908, 909f
hormonas, en el ciclo del ovario, 932 – 936, 933f
posterior, hormonas, 908, 909f, 924, 924f
trastornos, 912ap
Hipoglucemia, 629ap, 716ap
e intoxicación alcohólica, 643ap
Hipopituitarismo, 912ap
Hipotálamo
hormonas, 913t
en el ciclo del ovario, 932 – 936, 933f
hormonas liberadoras, 908, 910t, 911f, 923, 923t
sistema hormonal e, 908, 909f
tumores, 709ap
y regulación del apetito, 862ap, 864
Hipótesis del balanceo, 236, 236 – 237, 237t
Hipotiroidismo, 709ap
y obesidad, 862ap
Hipoxantina, 828
Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa, deficiencia, 293ap, 836ap
Hipurato, 790, 790f
Hipusina, 807, 807f
Histamina, 817, 818f, 1086, 1086t, 1087f
antagonistas en el receptor H_2, 1086
Histidasa, 816
deficiencia, 816ap
Histidina, 97, 97f, 816 – 818
distal, 395
formas ácida y básica, 445f
grupo guanidinio, 97f
grupo imidazolio, 97f
metabolismo, 816 – 818, 817f
próxima, 395
secuencias invariables, 385t
Histidina descarboxilasa, 817
Histidinemia, 816ap
Histonas, 67f, 68
unión al DNA para formar la cromatina, 347 – 349, 348f, 349f
HMG CoA. *Véase* Hidroxi metilglutaril CoA
hnRNA, 77t
H-NS, proteínas, 66
Holliday, unión de, 186, 187f, 188
Holoenzima, 210, 414
Holoproteína, 395
Homeodominios, proteínas con, 354
Homeostasis calórica, 872 – 875, 875, 1123
Homocisteína
acumulación, 805ap
producción, 803 – 804
Homocisteína desulfhidrasa, 804, 806f
Homocisteína metiltransferasa, 805
Hoogsteen, tripletes de bases, 51, 51 – 52, 51f
Hoogsteen inverso, tripletes de bases, 51 – 52, 51f, 52
Hormona adrenocorticotrópica, 908, 910
acciones, 913t, 948t
en la secreción de cortisol, 969f, 969t
origen, 913t
Hormona antidiurética. *Véase* Vasopresina
Hormona de crecimiento, 892, 910
acciones, 913t
hormona liberadora de, 910t
acciones, 913t
estructura, 923t
orígenes, 913t
Hormona del estrés, aldosterona como, 970 – 971
Hormona estimuladora de la tiroides, 910
Hormona estimuladora del folículo, 912, 969t, 971 – 972
acciones, 913t, 934, 934 – 936, 948t
interacciones hormona-receptor, 939
orígenes, 913t
secreción, regulación, 948 – 950, 949f
Hormona estimuladora del melanocito, 912
Hormona liberadora de corticotropina, 908, 910t
acciones, 913t, 948t
estructura, 923t
orígenes, 913t
Hormona liberadora de gonadotropina, 910t, 971
Hormona liberadora de hormona de crecimiento, 910t
Hormona liberadora de tirotropina, 910t
acciones, 913t, 948t
estructura, 923t
orígenes, 913t
Hormona luteinizante, 912, 969t, 971 – 972
acciones, 913t, 934, 934 – 936, 948t
interacciones hormona-receptor, 939, 939f
orígenes, 913t
secreción, regulación, 948 – 950, 949f
Hormona(s), 907. *Véase también* hormona específicas
acción intracelular, 943 – 953
de liberación
pulsátil, 908
rítmica cíclica, 909
derivadas de aminoácidos, 906, 919 – 923
elementos de respuesta a, 977, 977t
niveles séricos, 874t
progestacional, 960, 960, 963
receptores nucleares, 983, 984f
secreción, retroestimulación, 934
suprarrenal, 960
variaciones diurnas de la secreción de, 931
Hormona-receptor, interacciones, 925, 926f, 927, 936 – 939
subunidades hormonales múltiples en las, 939
unión en, 937f
Hormonas autocrinas, 907
Hormonas endocrinas, 907
Hormonas esteroides, 472, 906, 959 – 986, 1140 – 1141, 1175, 1178. *Véase también* Corticosteroides
acción, modelo de la, 974, 975f
cardiotónico, 523
colesterol como precursor, 741 – 742, 742f
cristalografía de rayos X, 962f
elementos de respuesta a hormona, 977, 977t

en la muerte celular programada, 985 – 986
estructura, 960, 961t, 962f, 963
funciones, 961t
inactivación metabólica de, 967, 968t
liberación, regulación, comunicación intracelular y, 967, 970 – 973
número de carbonos, 963
placentarias, 891
proteínas de unión, 973 – 974
receptores de. *Véase* Receptores de hormonas esteroides
rutas de excreción, 967, 968t
secreción, 961t
síntesis, 960, 963 – 966, 965f, 966f
citocromos P450, 472 – 475, 473f, 475f
durante el embarazo, 475ap
en el cuerpo lúteo, 963 – 964
regulación, comunicación intracelular y, 967, 970 – 973
regulación hormonal, 963, 963f, 967, 969t, 970 – 973
regulación por retroalimentación, 909f, 973
tipos de, 963
transporte en la sangre, 973 – 974
unión a la albúmina, 973 – 974
unión a receptores, 974 – 979
Hormonas gonadotrópicas, en el ciclo del ovario, 932 – 936, 933f
Hormonas liberadoras, 908, 909f, 910t, 923, 923t
Hormonas paracrinas, 907
Hormonas paratiroideas, 1142, 1144
Hormonas peptídicas, 906. *Véase también* Hormonas polipeptídicas
intestinales, 1087, 1088t
Hormonas polipeptídicas, 905 – 955. *Véase también* hormonas específicas
acción intracelular, 943 – 953
acciones, 912 – 915, 913t – 915t
de la hipófisis anterior, 910 – 912, 910t, 911f
degradación, 923 – 924
formación, 915 – 919
genes, 915 – 919
inactivación, 923 – 924
interacciones con el receptor. *Véase* Interacciones hormona-receptor
que contienen un puente disulfuro de cistina, 924, 924t
receptores
estructura, 940 – 941, 940f, 942f
internalización, 925, 941 – 943
secreción, regulación celular y, 925 – 931
transducción de señal, proteínas G en la, 925, 927, 927t
Hormonas sexuales, 960, 960, 963
en el ciclo del ovario, 932 – 936, 933f
globulina de fijación de, 974
síntesis, 964, 966f
Hormonas suprarrenales, 960
Hormonas tiroideas, 960
acciones, 913t
estructura, 922f
orígenes, 913t
receptor de, 979, 981
secreción, 928, 928f
síntesis, 803, 919 – 920, 922f
yodo en las, 1162
Horquillas, RNA, 79, 79f
Horquillas de replicación, 166, 166 – 172, 166f
cebado, 166 – 167, 168f
desenrollamiento de la hebras parentales, 169, 171, 171f
eliminación de cebadores, 167
ligación, 169, 170f
polaridad, 166, 167f
procesividad, 172, 172f
relleno del hueco, 167
separación de la hebras parentales, 169
síntesis, 167
HPLC. *Véase* Cromatografía líquida de alta resolución
HU, proteínas, 66
Hueco(s), eliminación de cebadores en el RNA, 167
Huella de masas peptídicas, 146
Huesos, desmineralización, 1144, 1163
Humo de los cigarrillos, 478
Hunter, enfermedad de, 688ap
Huntington, enfermedad de, 194, 257ap
Hurler-Scheie, enfermedad de, 688ap
Ictericia
fisiológica, 675ap
neonatal, 1074ap
no hemolítica, 675ap
obstructiva, y deficiencia de vitamina K, 1147
IDDM. *Véase* Diabetes mellitus, dependiente de insulina
Iduronato sulfatasa, deficiencia de, 688ap
IGF. *Véase* Factores de crecimiento similares a la insulina
Imidazolio, 403 – 404, 404f
IMP. *Véase* Inosina 5′-monofosfato; Inosina 5′-monofosfato
IMP deshidrogenasa, 833
Impedimento estérico, 138, 400f
Inactivación génica, metilación del DNA, 349 – 350, 349f, 350f
Inactivación por inserción, de plásmidos recombinantes, 292, 294f
Inanición, 863ap, 990, 1119
cetosis fisiológica por, 722
fuente de energía durante el, 722
niveles de sustrato y hormonas en sangre durante, 874t
y cetosis, 722
y equilibrio nitrogenado
Indicador, gen, 313 – 314
Indicadores, en inmunoensayos, enzimas utilizados como, 456
Índice de cooperatividad, 399, 399t
Índice de masa corporal, 709ap
Índice glucémico, 1126ap, 1130t
Índice metabólico basal, 1118 – 1119, 1162
Inducción, 331
Inductores gratuitos, 333
α-L-Iduronidasa, deficiencia de, 688ap
Infarto de miocardio, 378ap, 622ap
CPK sérica y, 457f
enzimas liberados después de un, 453f
isozimas LDH y, 457f, 458f
subunidades troponina como marcadores, 1024ap
tratamiento, eficacia, 452 – 453, 454ap
Infección(es)
efectos metabólicos, 892
por levaduras, 480
sobrecarga de hierro e, 1055ap
Inflamación
papel del ácido monohidroxi-icosatetraenoico, 774
y prostaglandinas, 770
Información genética, transcrita en una secuencia de aminoácidos, 95f
Ingestas dietéticas de referencia, 1138, 1138 – 1139
Ingestión proteica recomendada, 1122
Inhibición competitiva, 431 – 432
Inhibición irreversible, 433
Inhibición no competitiva reversible, 433f, 434
Inhibición por producto, 424
Inhibidor 1, 656
Inhibidor acompetitivo, 433
Inhibidor de la proteína C, 1044, 1044 – 1045
Inhibidor de la ruta del factor tisular, 1041, 1044f
Inhibidor de la tripsina, 381f, 1099
de páncreas, 1041
Inhibidores basados en el mecanismo, 482
Inhibidores competitivos, 431
Inhibidores de proteínas, 382 – 383, 383t
Inhibidores de serina proteasas, 1041
Inhibidores no competitivos, 432, 432 – 433, 433f
Inhibidores selectivos, 432ap
Inhibina, 913t, 934, 971
Iniciación de la traducción, sitios alternativos de la, 265
Iniciación de la transcripción, sitios alternativos, 264, 264 – 265
Iniciador tRNA, 246
Inmunización, 372ap
Inmunocompetencia, disminución en la deficiencia de hierro, 1161
Inmunodeficiencia, 826. *Véase también* SIDA; VIH
degradación de nucleósidos purínicos en, 839ap
severa combinada
deficiencia de adenosina desaminasa y, 839
terapia génica, 320ap
Inmunoensayos, unidos a enzimas, 456
Inmunoglobulina(s), 368, 368 – 377, 369f, 370f
A, 370t, 372ap
abzimas, 450
bucles hipervariables de la, 374f
clases, 370t
funciones, 372ap
D, 370t
deficiencia, 372ap
E, 370t, 372ap
en el plasma, 372ap
en secreciones mucosas, 372ap
estructura, 369 – 371, 372, 375f, 377, 377f
G, 369f, 370f, 370t, 372ap, 372f
cadena pesada, 376f
estructura, 373f, 374f
hidrólisis, 375f
isótopos, 376
genética, 376 – 377
M, 370t, 372ap, 372f
Masa molecular, 370t
plegamiento, 373, 373f, 377
Rh, 1074ap
secuencias de aminoácidos, 372
sintetizadas artificialmente, 450
Inosina 5′-monofosfato, 830, 833
Inositidos, transducción de señales, 732 – 733, 732f, 733f
Inositol, 497
Inositol trifosfato, 658 – 659, 659f, 1086
como segundo mensajero, 928 – 931
en la síntesis de hormonas esteroides, 963
Insuficiencia renal, y cambios metabólicos, 892
Insulina, 109, 110f, 266, 602, 602f, 617, 626
acciones, 626, 627f, 641, 653, 656, 659 – 660, 661f, 914t
transducción de señal en las, 944 – 945, 945f, 946f
efectos sobre la fosforilación de proteínas, 944 – 945, 945f
elemento de respuesta a, 642
estructura, diferencias en distintas especies, 111ap, 111t

estructura primaria, 111ap
orígenes, 914t
resistencia a la, 885 – 886
receptores de, 944, 944 – 945
síntesis, 330
y obesidad, 1124
Integrasa, 191
Integrasa λ, 190
Integrinas, 17
Interacciones de apilamiento, estabilidad de la doble hélice del DNA, 41, 41t
Interacciones electrostáticas, 137, 137f. *Véase también* Interacciones iónicas
Interacciones entre fármacos, citocromo P450, 481ap, 484ap
Interacciones fármacos-nutrientes, 1165, 1165t
Interacciones heterotrópicas, 437
Interacciones hidrofóbicas, 135, 136f, 1172
Interacciones homotrópicas, 437
Interacciones hormona-receptor, 925, 926f, 927, 936 – 939
Interacciones iónicas, 1172
Interacciones secundarias, 381
Interacciones π-electrón, 138f
Intercambiador de Cl^-/HCO_3^-, 520 – 521, 1091, 1092f, 1096
Intercambio iónico, 140
cromatografía, 141f
Intercambio sodio/hidrógeno (Na^+/H^+), 1091, 1092f
Interconversiones, 666, 668 – 670, 669f, 671 – 678, 672f
Interfase β-β, desoxihemoglobina, 406 – 407, 407f
Interleuquinas, 892
Intermedio de enzima acilado, 448
Intermedios glucolíticos, en las interconversiones de las pentosas fosfato, 668 – 670
Intermedios tetraédricos, 448
International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 415
Intestino(s)
delgado, 1084
activación de zimógenos pancreáticos en el, 1098 – 1099
funciones, 1083f, 1084 – 1085
sacaridasas, 1102, 1103t
transporte de aminoacidos y péptidos en el, 1099 – 1100, 1100ap
enfermedades, 797ap
función, 791, 865
grueso, funciones, 1083f, 1084
Intolerancia a la leche, 1103ap
Intolerancia glucídica, 1125. *Véase también* Diabetes mellitus
Intolerancia proteica lisinúrica familiar, 816ap
Intraluminal, digestión, 1084
Intrones, 74, 74 – 75, 75f
eliminación de precursores del mRNA, 225 – 226, 225f, 226f
Ión amonio cuaternario, 1170
Iones hidrógeno, 618
en la regulación de 6-fosfofructo-1-quinasa, 620 – 621
transporte, en células de mamíferos, 528t
Iones inorgánicos, transporte en células de mamíferos, 528t
Ionóforo de calcio, 529, 529f 526f, 529t
Ionóforos, 529 – 530, 529t
Ionóforos antibióticos, 529 – 530
IP3. *Véase* Inositol trifosfato
IS(s). *Véase* Secuencias de inserción
Islas CG, 349 – 350
Isobutarato, 898
Isocitrato, 554
Isocitrato deshidrogenasa, 555
Isodesmosina, 126
Isoeléctrico
pH, 103
punto, 1179
Isoenzimas (isozimas), 415, 456, 456 – 457, 784 – 785
Isoleucina, 96f, 787, 811, 812f. *Véase también* Aminoácidos de cadenas ramificadas
Isomaltasa, 1103t
Isomaltosa, 1174
$\Delta^{4,5}$-Isomerasa, 964
Isomerasa(s), 418
cis-trans -prolil, 133
proteína disulfuro, 133
Isomería cis-trans, 1171
Isomerización
aldosa-cetosa, 671 – 673
de ribulosa 5-fosfato, 668
en interconversión de azúcares, 671 – 673
Isómero(s), 1172 – 1173
estereoisómeros, 1171
de resonancia, 98
Isomorfismo estructural, 38
Isoniazida, 784, 1165t
Isopreno, 1178
Isopropiltiogalactósido, 333 – 334
Isozimas. *Véase* Isoenzimas
Isquemia/reperfusión, lesión, 488
Itraconazol, 480
Jabones, 1176
Jugo gástrico, 1097
k_1(constante de velocidad), 419
K_m (constante de Michaelis), 422 – 424, 424, 437
anormal, 454ap
cambios en, efectos fisiológicos, 423ap
determinación, mediante la gráfica de Lineweaver-Burk, 423 – 424
determinación gráfica, 424, 424f
significado, 423 – 424
Kasugamicina, inhibición de la síntesis de proteínas, 255
Ketoconazol, 480
Kilocalorías, 1118
Kilojoule, 1118
Klenow, fragmento, 284
Krabbe, enfermedad de, 683ap, 763t
Krebs, ciclo. *Véase* Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Kringle, dominios de, 1045
Ku, 190
Kwashiorkor, 863ap, 1122
L- (levo-), 1172
β-Lactamasa, 346
β-Lactámicos, antibióticos, absorción, 1100
Lactancia, 891 – 892
requerimientos de ácido fólico en la, 1156
Lactasa, 1085t, 1102, 1103t
insuficiencia (deficiencia), 1103ap, 1126
Lactato, *Véase también* Ácido láctico
gluconeogénesis a partir del, 631 – 632, 632f
transporte, en células de mamíferos, 528t
Lactato deshidrogenasa, 609
composición de subunidades, 457
en la gluconeogénesis, 631 – 632
reacciones catalizadas por, 604f, 609
tipos, 457
Lactoferrina, 1055, 1055
Lactógeno placentario, 891, 914t
Lactonas, 1170, 1174
Lactosa, 638, 891, 1084
estructura, 1101t, 1175
fuentes, 1101t
intolerancia a la, 1103ap, 1126
síntesis, 891 – 892
Lambert-Beer, relación, 453 – 454
Lambert-Eaton, síndrome miasténico de, 997ap
Lanzadera del glicerol fosfato, 584, 585f, 610 – 611, 610f
Lanzadera del malato-aspartato, 584, 585f, 610 – 611, 610f, 641, 642
LDL. *Véase* Lipoproteínas de baja densidad
Leber, neuropatía óptica hereditaria de, 588ap
Leche
intolerancia a la, 1103ap
unión de hierro en la, 1055
Leche materna, micronutrientes de la, 1147ap
Lecitina(s), 1177. *Véase también* Fosfatidilcolina
Lecitina:colesterol aciltransferasa, 749 – 750, 749f
Leflunomida, 841
Leptina
en la obesidad, 709ap, 710ap
gen, 864
Lesch-Nyhan, síndrome, 293ap, 454ap, 826, 835, 836ap
Lesión isquemia/reperfusión, 488, 591ap
Leucemia, tratamiento de la, 458, 854
Leucina, 95, 96f, 635
cremallera de, 355, 356f, 389, 389f, 390f
curva de titulación, 103f
forma iónica, 103f
metabolismo, 787, 811 – 812, 813f
y gluconeogénesis, 634 – 636
Leucina aminopeptidasa, 1085t
Leucocitos, metabolismo glucídico en los, 600
Leucodistrofia globoide, 763t
Leucodistrofia metacromática, 683ap, 763t
Leucotrienos, 475, 1176
estructura, 1176
procedencia, 772 – 773, 772f, 773f
procesos fisiológicos afectados por los, 773 – 774
Leucovorina, 856
Levaduras
cromosomas artificiales de, 307
infecciones por, 480
Levulosa, para la eliminación de amoníaco, 790
Lewis, ácidos de, 428 – 430
LexA, 202 – 203
LH. *Véase* Hormona leutinizante
Liasas, 418
Liberación, en el transporte a través de membranas, 515
Ligandina, 1072
Ligando, 436. *Véase también* Interacciones hormona-receptor
Ligasas, 418, 420 – 421. *Véase también* DNA ligasas
Lignina, 1127, 1127t
LINE, 191
Línea Z, 1018
Lineweaver-Burk, gráfica, 424, 424f
Linfocitos, 867
Linoleil CoA, oxidación, 718f
Lipasa ácida lisosómica
deficiencia, 21ap
en la enfermedad de Wolman, 21ap
en la enfermedad del almacenamiento de ésteres de colesterol, 21ap
Lipasa estable a ácido, 1104
Lipasa pancreática, 1104 – 1105, 1105f
deficiencia, 1142ap
Lipasa sensible a hormona, 882
actividad en la obesidad, 1124
Lipasas
en digestión de lípidos, 1104 – 1105
en el tejido adiposo, 709
estable a ácido, 1104 – 1105

hidrólisis de triacilgliceroles sanguíneos, 712
mecanismo de acción, 1104 – 1105, 1105f
Lípido(s), 694, 1175, 1175 – 1178
absorción, 1104 – 1110, 1104f
anfipáticos, 1175
digestión, 1103f, 1104 – 1105, 1104 – 1110
distribución asimétrica, 508
enfermedades del almacenamiento de, 761
estructuras vesiculares, 502. *Véase también* Micelas
enzimas hidrolizantes de20t
funciones, 694 – 695
funciones biológicas, 697
hidrofobicidad, 697
insaponificables, 1175
membrana, 494, 495 – 502, 495f, 500 – 501, 501f
difusión, 509 – 511
distribución asimétrica, 508
movilidad, 503, 503f
movimiento transversal, 509
metabolismo, 693 – 723, 722f, 727 – 774
ácidos oxi-icosatetraenoicos, 770 – 774
colesterol. *Véase* Colesterol
esfingolípidos. *Véase* Esfingolípidos
fosfolípidos. *Véase* Fosfolípidos
lipooxigenasa, 770 – 774
prostaglandinas, 766 – 770
tromboxanos, 766 – 770
oligosacáridos unidos a, 681 – 682, 682f
saponificables, 1175
solubilización durante la digestión, 1104, 1105, 1107 – 1108
Lipoamida, 549
Lipocortina, 978
Lipofilina, 502
Lipofuscina, 21
Lipogénesis, 864f, 865
Lipólisis, 868
Lipopolisacáridos, 487
Lipoproteína lipasa, 452, 711ap, 712, 712t, 865
Lipoproteína(s), 127 – 129, 502.
clases densitométricas hidratadas, 127t
composición química, 129t
densidad, 127f
estructura, 130f
en hiperlipidemias, 127ap
en hipolipoproteinemias, 128ap
inhibidor de la coagulación asociado a la lipoproteína, 1041, 1044f
movilidad electroforética, 128f
Lipoproteínas de alta densidad, 127, 711
funciones, 749 – 750
síntesis, 749
Lipoproteínas de baja densidad, 128, 711
gen del receptor, activación de la transcripción, 359 – 360, 359f, 360f
oxidación, 1146
síntesis de colesterol, 751 – 752
Lipoproteínas de densidad intermedia, 128
Lipoproteínas de muy baja densidad, 128, 711, 865
en la obesidad, 1124
síntesis, 749
síntesis de colesterol, 750, 751
Liposomas, 503
estructura, 503 – 504, 503f
para la administración de drogas, 504ap
preparación, 504
β-Lipotropina, 908, 910, 915, 916t
γ-Lipotropina, 915, 916t
Lipoxigenasa, 770 – 774
ácidos monohidroperoxi-icosatetraenoicos
procedencia, 772 – 773, 772f, 773f
procesos fisiológicos que afectan, 773 – 774
Lisil hidroxilasa, deficiencia, 271ap
Lisil oxidasa, 1163
Lisina, 97, 126f, 635, 812, 815 – 816
metabolismo
producto minoritario, 815f
trastornos, 816ap
y gluconeogénesis, 634 – 636
Lisina aminooxidasa, 125
Lisinúrica, intolerancia proteica familiar, 816ap
Liso-compuesto, 1177
Lisofosfolípidos, reacciones de remodelado, 739, 740f
Lisosomas, 20, 20 – 22, 262, 273, 923
en la deficiencia de lipasa, 21ap
Lisozima, 441, 442f, 444f, 446f
centro activo, unión de un hexasacárido, 441, 442f
Litio
terapia para la enfermedad maníaco depresiva, 931, 931ap
y ciclo del fosfatidilinositol, 930f, 931, 931ap
Litocolato, 1111
Llave y cerradura, modelo de, 441, 441f
London, fuerzas de dispersión, 137 – 138, 138f
Longitud de contorno, DNA, 58, 58 – 59
Luft, enfermedad de, 19ap
Luteólisis, 985ap
M, fase, 178
Macrominerales, 1159 – 1161
Macronutrientes, 1117 – 1132. *Véase también* Glúcido(s); Metabolismo glucídico; Energía; Fibras de la dieta;
Maduración (modificación) del RNA, 208
Magnesio, 1161
en el centro activo de las quinasas, 430f
Malabsorción, 1164
de grasas, 1144
y deficiencia de vitamina K, 1147
debidas a la pérdida de sistemas de transporte de membrana, 529ap
deficiencia de niacina en la, 1151
fructosa, 529ap
glucosa, 529ap
Malato deshidrogenasa, 611, 703
Malato-aspartato, lanzadera del, 584, 585f, 610 – 611, 610f, 641, 642
Malestar, en la deficiencia de vitaminas, 1148
Malnutrición, 1118
Malnutrición proteica, 863ap
Malonato, 575
Malonil CoA, 715
formación, 698 – 700
Malos metabolizadores, 485
Maltasa, 1085t, 1103t
Maltosa, 1102, 1174
Maltotriosa, 1102
Manganeso, 1164
Maníaco depresiva, enfermedad, tratamiento con litio, 931, 931ap
Mano EF, 524
Manosa 6-fosfato, 262, 263f, 673
Manosa, 1172
α-Manosidosis, 683ap
β-Manosidosis, 683ap
Mapa de densidad electrónica, 149, 150f
Mapas de restricción, 282 – 284, 283, 283f
y evolución, 284ap
Marasmo, 863ap, 1122
Marcaje del DNA genómico, 349
Marco secuencial sin solapamiento, 236
Maroteaux-Lamy, enfermedad de, 688ap
Masa molecular y coeficiente Svedberg, 142f
Material fibroso, 1082. *Véase también* Fibra
Matriz mitocondrial, señal de destino a la, 263, 263 – 264
Maxam-Gilbert, procedimiento para la secuenciación del DNA, 284 – 285, 285f
McArdle, enfermedad de, 647ap
MCM (proteína de mantenimiento del minicromosoma), 177, 177 – 178
Mecanismo de amplificación, en la regulación de la glucógeno fosforilasa, 654
Mecanismo de cambio de unión, 580
Mecanismo ping-pong, 425, 425 – 426, 425f
Mecanismo secuencial, 426
Mecanismos del ciclo Q, en el complejo III, 572, 572f
Mediadores fisiológicos, 826 – 827
Melanina, 801 – 803, 802f
Melanocito, hormona estimuladora del, 912
acciones, 913t
orígenes, 913t
síntesis, 915, 916t
Melatonina, 810 – 811
estructura, 810f
secreción, 932
síntesis, 932, 932f
Mella, desplazamiento de la, 296, 296f
Membrana externa mitocondrial, 563, 563f,564t
Membrana(s), 14, 14 – 15
apariencia trilaminar, 494, 494f
asimetría, 507
canales, 512 – 513, 513t, 516 – 518
estructura, 516, 516f
funciones, 516, 516f
regulación, 516 – 518, 518ap
celular, 494, 500 – 501, 501f
colesterol en, 500
composición química, 494 – 502
despolarización, 659 – 660
difusión de moléculas, 504, 512, 512f. *Véase también* Transporte a través de membrana
difusión de proteínas y lípidos en, 509 – 511
esfingolípidos, 498 – 499
estructura, 505 – 511
eritrocito como modelo, 508, 508f
modelo de mosaico fluido, 505, 505f, 511f
eucariótica, 494
fluidez, 509 – 510
anormalidades, 510ap
factores que afectan a la, 510 – 511, 510ap
funciones de los fosfolípidos en las, 730 – 734
anclaje de glucoproteína a la membrana plasmática, 733 – 734, 734f
función pulmonar, 730 – 732, 731f
transducción de señales, 732 – 733, 732f, 733f
glúcidos, 502, 502f
intracelular, 494
lípidos, 494, 495 – 502, 495f, 500 – 501, 501f
difusión, 509 – 511
distribución asimétrica, 508
movilidad, 503, 503f
movimiento tranversal, 509
microscopia electrónica, 494, 494f
mitocondrial
estructura y compartimentación mediante, 561, 562f, 563 – 564
externa, 563, 563f, 564t
interna, 563, 563f, 564t
movimiento, 494
movimiento molecular a través de , 511 – 516. *Véase también* Transporte a través de membrana
facilitado, 512 – 513
papel funcional, 16 – 22
poros, 512 – 513, 513, 513t, 516 – 518

proteínas, 495f, 505
clasificación, 502
difusión, 509 – 511
distribución, 507 – 508
extracción, 502
funciones, 502
movilidad, 511 – 512, 511f
proteínas integrales (o intrínsecas), 502
dominios, 507
en bicapa lipídica, 505 – 507, 506f
segmento transmembrana, 505 – 506, 506f
proteínas periféricas (o extrínsecas), 502, 507
unión, 507 – 508
sistemas artificiales, 504
temperatura de cambio de fase, 509 – 510, 510f
Membranas plasmáticas, 4, 17, 494, 494f
eritrocito
distribución asimétrica de lípidos en, 508 – 509, 509f
fluidez, colesterol y, 510ap
anclaje de glucoproteína a, 733 – 734, 734f
estructura, 507, 508f
de células epiteliales del intestino delgado
contraluminal, 1089 – 1090, 1089t
luminal, 1089 – 1090, 1089t
función, 4 – 6, 17
funciones, 494
glucoproteínas, 502
lípidos en, 500 – 501
proteínas en, distribución, 507
sistemas de transporte, 512 – 513
transporte de glucosa a través, dependiente de sodio, 526, 526f
uniones en hendidura, 518 – 519, 518f, 519f
Membranas procarióticas, 494
Menke, síndrome de, 1163
Mensajeros intracelulares, iones calcio como, 523 – 524
Mensajeros monocistrónico, 234
Menstruación, 934
6-Mercaptopurina, 436, 436f, 854, 854f
Meromiosina ligera, 1019
Meromiosina pesada, 1019
Meselson-Radding, modelo, 188 – 189, 188f, 189
Metabolismo
aeróbico, fuente de ATP para la córnea, 1003
benzo[*a*]pireno, 476 – 478, 478f
de los ácidos biliares, 1110 – 1112, 1110f
del hierro, 1054, 1161, 1161f
disponibilidad de sustrato y, 877
durante enfermedades y recuperación de pacientes
en el ejercicio, 890f
en el embarazo, 891f
en el estrés, 892, 893f
en la acidosis, 897f
en la diabetes mellitus
dependiente de insulina (IDDM), 888f
mellitus tipo 1, 888f
no dependiente de insulina, 887f
tipo 2, 887f
en la enfermedad hepática, 894f
en la ingestión de alcohol, 896f
en la insuficiencia renal, 895f
en la lactancia, 892f
interacciones entre órganos, 870 – 872
interrelaciones de tejidos, 861 – 899
metilmalonato, 814ap
paracetamol, 478 – 479, 479f, 480ap
rutas, regulación, 877
terfenadina, 481ap
tiroideo del yodo, 1162
triptófano, 810 – 811
y obesidad, 886f, 1124 – 1125
Metabolismo bacteriano, 784
Metabolismo basal, índice, 1118 – 1119, 1162
Metabolismo glucídico
aplicaciones clínicas
anemia hemolítica, 668ap
aspartiglucosilaminuria, 683ap
componentes de los grupos sanguíneos, 679ap
galactosemia, 673ap
heparina como anticoagulante, 685ap
ictericia, 675ap
intolerancia a la fructosa, 673ap
mucopolisacaridosis, 688ap
pentosuria, 675ap
glucoconjugados y, 665 – 688
rutas especiales, 665 – 688
rutas principales, 597 – 661
y cuerpos cetónicos, 722f
Metabolizadores rápidos, 485
Metal(es)
en la activación de oxígeno molecular, 430
en la oxidación y la reducción, 430
funciones estructurales, 428 – 430
Metal de transición, 430
Metaloenzimas, 429
de cobre, 1163
de zinc, 1162
Metaloproteasas, 378
Metalotioneína, 1162
Metarrodopsina II, 1010, **1010**, 1012
Metilación
bases del DNA, 347, 349 – 350, 349f, 350f
de aminoácidos, 267, 267 – 268
Metilasa de mantenimiento, 197
O^6-Metil guanina metil transferasa, 199
N^5,N^{10}-Metilenotetrahidrofolato
en la síntesis de desoxitimidilato, 845 – 846
estructura, 845f
producción, 794, 795f
7-Metilguanosina, 234
Metilmalonato, enfermedades del metabolismo, 814ap
Metilmalonil CoA, 706, 814f, 1156 – 1157
Metilmalonil mutasa, 812
N^5-Metiltetrahidrofolato, 805, 1154, 1154f, 1157
5′-Metiltioadenosina, 835
5′-Metiltioadenosina fosforilasa, 835
5-Metiltiorribosa-1-fosfato, 835
O-Metiltransferasa, 800 – 802
Metionina, 97, 803 – 804, 803f, 806, 806f, 1155f, 1156
Metionina adenosiltransferasa, 803
Metotrexato, 435, 435f, 855
estructura, comparación con la estructura del ácido fólico, 855f
inhibición, 855f
mecanismo de acción, 435
Met-tRNA, 246
Miastenia grave, 434ap, 999ap
Micelas, 502
ácidos biliares, 1105, 1107 – 1108
concentración crítica, 502, 1105, 1107f
en el transporte de colesterol, 1107, 1108, 1109ap
en el transporte de vitaminas, 1108
estructura, 502 – 503, 503f
forma lineal, 424
formación, 502 – 503, 1176
formulación, 422, 423
mixtas, 1107, 1108f
Michaelis, constante. *Véase* K_m
Michaelis-Menten. *Véase*
Microcuerpos, 22
Microentornos, 6
Microheterogeneidad de glucoproteínas, 680
Microhomología, 190
Micronutrientes, 1137 – 1165. *Véase también* Minerales; Vitamina(s); vitaminas específicas
Microsomas, 18, 245f
Microtúbulos, 22
Microvilli, 1084 – 1085
Mielina, lipoproteínas, 502
Migración de las ramas, 186, 188
Mimetismo molecular, 251
Minerales
macrominerales, 1159 – 1161
oligoelementos, 1161 – 1164
Mineralocorticoide(s), 1178
mutaciones, 984ap
receptores de, 977
Mioglobina
aspectos moleculares, 393 – 409
características de la fijación, 395, 395f
comparación con la cadena β de HbA1, 398f
curva de fijación de oxígeno, 399f
estructura, 393 – 409, 395 – 396, 395f, 396, 398f
gráfica de hill para la HbA1, 399f
secuencias de aminoácidos, 397t
unión de oxígeno, 397 – 399, 399f
Mioglobina, 393
Miopatías mitocondriales, 589ap
Mioquinasa, 619. *Véase también* Adenilato quinasa
Miosina, 22, 1018 – 1021, 1020f, 1021f
Miosina fosfatasa, 1031
Miosina-ATPasa 1027
Mitocondria, 19
alargamiento de ácidos grasos en la, 704f
ATP-ADP translocasa, 521 – 522, 521f
biosíntesis en la, 701 – 703
en la enfermedad de Luft, 19ap
espacio intermembrana, 563, 563f, 564t
flavoproteína donadora de electrones, 469, 470f
genes, 587 – 589, 588f, 588t
importación de proteínas, 262 – 264
lanzaderas de sustrato, 584, 585f
membrana interna, 563, 563f, 564t, 583 – 587, 583f
membranas
estructura y compartimentación mediante, 561, 562f, 563 – 564
interna y externa, composiciones y funciones, 563, 563f, 564t
transporte a través de, 713 – 716, 715ap
mtRNA, 77t, 85
receptores, 264
síntesis de proteínas en, 251 – 252, 254
sistemas de transporte, 521 – 522, 521f
sistemas de transporte de aniones, 521, 521f
transportador de calcio, 585 – 586, 586f
transporte de nucleótidos de adenina y de fosfato, 583 – 584, 583f
transporte electrónico. *Véase* Transporte electrónico
Mitosol, 19
Mixotiazol, 575
Mobilferrina, 1058ap
Modelo concertado, 439
Modelo de corte de doble cadena, 189 – 190, 189f
Modelo de encaje inducido, 441, 441f
Modelo de llave y cerradura, 441, 441f
Modelo de Meselson-Radding, 188 – 189, 188f, 189
Modelo de mosaico fluido, de membranas, 505, 505f, 511f

Modelo secuencial, 440
Modelo secuencial de encaje inducido, 440
Modificación covalente, 624, 879 – 883
Modificadores, 436
Modulador de la disociación de oxígeno 2,3-bisfosfoglicerato, 406, 406 – 407, 406f, 407f
Modulador negativo, 440
Modulador positivo, 440, 438
Moduladores, 436
Moduladores alostéricos, 833f
Moldes, replicación del DNA, 162, 162 – 163, 163f
Moléculas aceptoras, 151, 258
Moléculas anfipáticas, 7, 498
Moléculas dadoras, 151
Moléculas hidrofóbicas, 694
Moléculas no polares, 694
Molibdeno, 1164
Monensina, 529t
Monoacilglicerol hidrolasa, en la hidrólisis de los triacilgliceroles, 712
Monoacilgliceroles, 696, 1105, 1107, 1176
Monoamina oxidasa, 800 – 802, 1000, 1000f
Monocistrónico
  mensajeros, 234
  RNA, 84
Monooxigenación, 467
Monooxigenasas, 416f, 417, 417f, 466
Monosacárido(s), 258, 1100, 1171
  absorción, 1103
  derivados, 1173 – 1174
  en la transformación de glúcidos, 666
  ésteres, 1174
  estructura, 1172
  reacciones, 1174
Monóxido de carbono, 575, 1071
Morquio, síndrome de, 688ap
Motivo bucle-hoja hélice, 391, 392f
Motivo cremallera de leucina, 389, 389f, 390f
Motivos aminoacídicos, 354
Motivos estructurales, 115 – 116, 116
Motores moleculares, 22
Movilidad electroforética, ensayo del corrimiento de la, 301, 302f
Movimiento flip-flop, 504, 507, 508
6-MP. *Véase* 6-Mercaptopurina
mRNA. *Véase* RNA mensajero
MSH. *Véase* Hormona estimuladora del melanocito
mt mRNA, 77t
mt rRNA, 77t
mt tRNA, 77t
mtRNA, 85
Mucolipidosis
  tipo I, 683ap
  tipo VII, 688ap
Mucopolisacáridos, 1175. *Véase también* Proteoglucanos
Mucopolisacaridosis, 687 – 688, 688ap
Mucosa intestinal, síntesis de triacilgliceroles, 708
Muerte celular planificada, 786. *Véase también* Apoptosis
Muerte súbita infantil, síndrome de la, 300ap, 716ap
Mujeres
  consideraciones nutricionales para las, 1164 – 1165
  programa WIC del Congreso de los Estados Unidos, 1160, 1162
Múltiples dominios distintos, 382, 382f
Múltiples sitios de clonación, 289
Muscarina, 1086, 1087f
Muscilaginosas, fibras, 1127, 1127t
Músculo
  cardíaco, enfermedades del, y canales iónicos, 1027ap
  células, 1016 – 1017, 1018f
  contracción, 1016 – 1031
    filamentos gruesos, 1018 – 1021, 1020f, 1021f
    fuente de energía, 1027 – 1028
    modelo 1028 – 1030, 1028f – 1029f
    modelo del filamento deslizante, 1016
    proteínas de filamento delgado, 1021, 1021t, 1022f – 1024f, 1023 – 1025
    regulación del calcio, 1030 – 1031, 1030f
    requerimiento de calcio, 1025, 1025f, 1027
    transducción de señal, 1016 – 1018, 1017f, 1018f, 1019t
  esquelético
  contracción. *Véase* Músculo, contracción
    degradación de glucógeno en el, regulación, 659, 660f
  fibras
    blancas, 644, 645f
    metabolismo glucídico en las, 600
    rojas, 644, 645f
  glucógeno en el, 643
  liso, regulación por calcio de la contracción del, 1030 – 1031, 1030f
  reservas energéticas en los, 873t
Mutaciones, 192 – 194, 192f, 238 – 239, 239t, 240f, 240t
  cambio de sentido, 193, 193f, 238, 238ap
  cis-dominantes, 335
  constitutivas del operador, 335
  constitutivas del represor, 334
  de cambio de la pauta de lectura, 193, 239
  de cambio de sentido, 193, 193f, 238, 238ap
  de deleción, 312 – 313, 314f
  del rRNa mitocondrial, 254ap
  deleción, 312 – 313, 314f
  enfermedades causadas por, 426ap
  espontáneas, 300ap
  inserción, 312 – 313, 313f
  marco de lectura, 191, 239
    VIH, 241ap
  puntuales, 193
  señales de corte y empalme del mRNA, 227, 227f
  silenciosas, 238
  sin sentido, 193, 193f, 238
  supresoras, 241
  trans-dominantes, 335
Mutagénesis
  PCR inversa, 316, 317f
Mutagénesis dirigida, 312, 312 – 317
  de un único nucleótido, 315 – 317, 316f
  del virus herpes símplex tipo I glucoproteína D, 315ap
Mutarrotación, 1173, 1174
Mutasas, 418
Mycobacterium tuberculosis, citocromo P450, 486
Na^+. *Véase* Sodio
NaCl, movimientos transepiteliales, 1090 – 1091
NAD. *Véase* Nicotinamida adenina dinucleótido
NAD^+/NADH, relación, alteración, 895 – 896
NADH, 604f, 609 – 610, 811
  reoxidación, 610 – 611
NADH peroxidasa, 417
NADH-citodromo b_5 reductasa, 469
NADPH. *Véase* Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH-adrenodoxina reductasa, 469, 470f
NADPH-citocromo b_5 reductasa, 704
NADPH-citocromo P450 reductasa, 468 – 469, 469f
$NaHCO_3$, secreción por el epitelio intestinal, 1092 – 1093, 1094f
NANA. *Véase* Ácido *N*-acetilneuramínico
Necrosis tumoral, factor de la, 23ap, 886, 892, 893ap, 953
Neomicinas, inhibición de la síntesis de proteínas, 254, 254 – 255
Neonatos
  consideraciones nutricionales en los, 1147ap
  síntesis cerebral de lípidos en, 722
Neonatos, enfermedad hemorrágica en el, 1147ap, 1148ap
Nernst, ecuación, 565
Neurocán, 688
Neurofisina, 908, 915
  typo I, síntesis, 916, 917f, 918
  typo II, síntesis, 916
Neuronas, 991, 991f
  aminérgicas, 908
  ATP y potencial transmembrana, 991, 992f, 993
  presinápticas, 994
  sinapsis, 993 – 994, 993f, 993t, 994f
Neuronas presinápticas, 994
Neuropatía óptica hereditaria de Leber, 588ap
Neuropatía periférica, 719ap
  en la deficiencia de vitaminas, 1148
Neuropéptidos, 1001 – 1002, 1002t
Neurotensina, 914t
Neurotoxinas, 518
Neurotransmisores, 893 – 894, 919
  excitadores, 993
  inhibidores, 993
  metabolismo del triptófano y, 810 – 811
  peptídicos, 1001 – 1002, 1002t
  síntesis, almacenamiento y liberación, 994 – 998, 995f, 995t, 996f
  terminación de señales en la unión sináptica, 998 – 1001
  transporte, en células de mamíferos, 528t
Neurotransmisores excitadores, 993
Neurotransmisores peptídicos, 1001, 1001 – 1002, 1002t
Neutrófilos, efectos del HETE, 774
Neutrones, difracción de, 149
Niacina, 426, 1151
  coenzimas, 426 – 427, 455f
  deficiencia, 809, 1151
    en el alcoholismo, 1151
  equivalentes de, 1151
  requerimientos de, 1151
  síntesis, 1151
Nicotinamida, coenzimas, espectro de absorción, 455
Nicotinamida adenina dinucleótido, 426, 427f, 539, 539f, 540f, 850 – 852
  en la glucólisis, 609 – 610
  propiedades ópticas, 453 – 455
  síntesis, 808 – 809, 850f, 853
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, 426
  oxidación, 797
  propiedades ópticas, 453 – 455
  síntesis, 666 – 668, 667f, 671
  transporte electrónico del citocromo P450, 468 – 470, 468f, 469f
NIDDM. *Véase* Diabetes mellitus, no dependiente de insulina
Niemann-Pick, enfermedad de, 763t
  y retinitis pigmentosa, 1007ap
Nigericina, 529, 529t, 530f
Niños
  equilibrio nitrogenado en, 782
  síntesis de urea en los, 788
Nitratos, para la angina de pecho, 622ap

Nitrógeno
entrada en la dieta humana, 780, 780f
excreción. *Véase* Ciclo de la urea
incorporación en los aminoácidos, 781 – 786
transporte entre órganos, 786 – 787, 787f
Nitroglicerina, para la angina de pecho, 622ap
NMR. *Véase* Resonancia magnética nuclear
NO. *Véase* Óxido nítrico
No electrolitos,7
Nonactina, 529t
Noradrenalina, 919, 1000, 1000f
acciones, 948t
productos de excreción urinaria, 802f
síntesis, 799 – 801, 1151
transporte, en células de mamíferos, 528t
Northern, transferencia, 300
Nucleasa(s), 838
ensayo de protección frente a la, 300 – 301, 301f
recambio del RNA, 229 – 230
Núcleo, 18
Núcleo de los esteroides, 960f
Nucleobases purínicas, recuperación de, 835, 835f
Nucleofilamentos, 70, 70f
Nucleoides, 66, 66 – 67, 66f
Nucleolo, 18
Nucleósido(s), 30, 30f, 1179
desoxirribopirimidínicos, 846
enlaces fosfodiéster, 33
nomenclatura de los, 1179
pirimidínicos, 829f
propiedades estructurales, 32 – 33, 32f, 33f
propiedades físicas, 31
purínicos, degradación, en la inmunodeficiencia, 839ap
tRNA, modificado, 221
Nucleósido 5′-difosfato reductasa, 844
Nucleósido 5′-trifosfatos, regulación de la ribonucleótido reductasa por, 844t
Nucleósido desaminasa, 846
Nucleósido difosfato quinasa, 631, 649, 833
Nucleósido purínico fosforilasa, 838, 839ap
deficiencia y e inmunodeficiencia de las células T, 839
Nucleósido quinasas, 848
Nucléosidos de pirimidina, 829f
Nucleósidos desoxirribopirimidina, 846
Nucleosomas, 348
Nucleosomas, 68, 69f, 70, 70f, 177
transcripción, 214, 214 – 215, 215f
Nucleotidasa(s), especificidad, 837 – 838
5′-Nucleotidasa citosólica, actividad incrementada de la, 839ap
Nucleótido(s), 29, 31, 32f, 1179
absorción de luz ultravioleta, 828 – 829
adenina, 828f
coenzimas, síntesis, 850 – 852
desoxirribopirimidínicos, 846
desoxitimidina, síntesis, 845
distribución, 827
equilibrio entre adenina y guanina, 835 – 836
fuentes, 826
funciones metabólicas, 826 – 827
metabolismo, 854 – 855, 856 – 857
modificados, 237
nomenclatura de los, 1179
propiedades, 828 – 830
estructurales, 32, 32f
físicas, 31
purina. *Véase* Purina(s)
pirimidina. *Véase* Pirimidina(s)
química, 828 – 830
recuperación, 843
regulación, 826
síntesis, 853 – 854
sobreproducción, 834ap
traducción, 235 – 236
uracilo, 829f
Nucleótido de adenina translocasa, 583, 583 – 584, 583f
Nucleótido quinasas, 848
Número de enlace, 169
Número de recambio, 421
Nutrasweet, 882
Nutrición
definición, 1118
dieta equilibrada recomendada y, 1131 – 1132
dieta prudente y, 1131 – 1132
dietas vegetarianas y, 1164
en el alcoholismo, 1150ap
en la fibrosis quística, 1142ap
ensayos bioquímicos para las, 1138
estado de buena nutrición, 864f, 885 – 886
estudios de la ingesta de la dieta, 1138
evaluación de la, 1138
neonatal, 1147ap
objetivos dietéticos en los Estados Unidos, 1131 – 1132, 1131f
óptima, 1118
parenteral total, y deficiencia de zinc, 1162
proteína y energía, 1122
síntomas clínicos, 1138
y enfermedad renal, 1121ap
Nutrientes, 1082. *Véase también* Macronutrientes; Micronutrientes; nutrientes específicos
absorción, 1083f, 1084
contenido energético de los, 543, 543t
transporte epitelial, 1095 – 1096
Obesidad, 694, 709ap, 710ap, 862ap, 863, 885 – 886, 1124
consideraciones genéticas, 862ap, 1124
consideraciones sobre la dieta, 1124
efectos metabólicos, 1124 – 1125
gen de la, 1124
implicaciones sobre la salud, 1124 – 1125
leptina y, 709ap, 710ap
prevención de la absorción de grasas, 1106ap
regímenes para reducir el peso y, 1125
y diabetes mellitus no dependiente de insulina, 887ap
y diabetes mellitus tipo 2, 887ap
Objetivos dietéticos en los Estados Unidos, 1131 – 1132, 1131f
Oftalmoplejia, 1149
en la deficiencia de tiamina, 1149
Ojo(s), 1002 – 1016, 1003f
córnea, 1003
fuente de ATP, 1003
cristalino, composición, 1003 – 1005, 1004f, 1004t, 1005f, 1005t
cromosomas para la visión, 1014, 1015ap, 1016
enfermedades, 816ap
localización cromosómica de los genes para la visión, 1015ap
pérdida de la visión, 816ap, 1006ap
retina, 1003
fuente de ATP, 1005 – 1006
retinitis pigmentosa, 1009ap – 1010ap
transducción visual, 1006, 1007f
visión del color, 1013 – 1014, 1015f, 1016
Okazaki, fragmentos, 166
Olestra, 1106ap
Oligo-1,6-glucosidasa. *Véase* Isomaltasa
Oligoelementos, 1161 – 1164
Oligomicina, 578
Oligonucleótidos, 34
estructura, 34f
Oligosacaridasas, 1085
Oligosacáridos, 502, 1172, 1174 – 1175
de ceramida, 1177
unidos a lípidos, 681 – 682
biosíntesis, 682f
N-Oligosacáridos
tipo complejo de, 260, 260f
tipo con alto contenido en manosa de, 260, 260f
Oligosacáridos de ceramida, 1177
Oligosacáridos unidos a lípidos, 681 – 682, 682f
Omeprazol, 1096, 1096f
OMP descarboxilasa, 843, 843f
Oncogén *HER-2/neu*, 953
Oncogenes, 952, 954t
conocidos, 954t
funciones de receptor de, 452 – 453
Operador, 333
Operón *ilv*, 343
Operón lactosa, 332 – 338, 332f
control de, 333 – 335, 334f
elementos de control, 335 – 336, 335f
represor, 333 – 335
secuencia del operador, 335 – 336
secuencia del promotor, 335f, 336 – 337
Operón *thr*, 343
Operón triptófano
atenuación, modelo para el, 341 – 343, 342f
control por proteína represora, 338 – 340
E. coli, 338 – 343, 339f
elementos de control, secuencia de nucleótidos de, 339, 340f
sitio atenuador, 340f, 341
estructura secundaria, 341, 342f
sitios de control, 338 – 343
Operones, 330 – 332, 331. *Véase también* Operón lactosa; Operón triptófano
autorregulación, 344, 344f
bacterianos, 343 – 345
biosintéticos de *E. coli*
atenuación de la transcripción, 341 – 343
secuencias del péptido conductor, 341 – 343, 342f
E. coli, proteína ribosómica, 343 – 344, 343f
Opsina, 1007
ORC. *Véase* Complejo de reconocimiento del origen
Orden cero, reacciones de, 420
Orden de reacción, 419
Orgánulos, papel funcional, 16 – 22
Origen de replicación, 67, 177
Orlistat, 1106ap
Ornitina, 788, 871
descarboxilación, 793f
niveles elevados, 816ap
síntesis, 792, 792f
Ornitina transcarbamilasa, 788, 789f
deficiencia, 791ap
Orotato, formación, 840
Osmorreceptor, 946
Osteocalcina, 1147
Osteodistrofia renal, 1143ap
Osteogénesis imperfecta, 270ap
Osteomalacia, 1144
Osteoporosis, 1147, 1158, 1159 – 1161
calcio y, 1159 – 1161
dieta y, 1160ap
Ouabaína, 523, 523f
Ovario, ciclo del, 932, 932 – 933, 935f
Ovejas, clonación de, 323
Overhauser, efectos nucleares, 153
Ovillo estadístico, 35
Oxalacetato, 553
Oxalato, 794

β-Oxidación
pasos, 714 – 716, 714f
ruta, 714f
y biosíntesis de palmitato, comparación, 715
Oxidación, 713, 1063 – 1065, 1065f, 1171, 1176
Oxidación de ácidos grasos, 640
Oxidación-reducción, reacciones, 416, 564-565, 1171
Oxidantes, 564
Oxidasas, 416, 416f
de función mixta, 704
Óxido nítrico, 407, 486, 791, 871, 871f
cisteína 93 de las cadenas β (βCys^{93}) y, 407 – 408, 408f, 409f
descarga por la hemoglobina, 407 – 408, 408f, 409f
producción, aspectos clínicos, 487ap
transporte por hemoglobina, 407
Óxido nítrico sintasas, 486 – 488
estructura, 487 – 488, 488f
funciones fisiológicas, 486 – 487
Oxidorreductasas, 416 – 417
Oxigenasas, 416, 416f
Oxígeno
curva de saturación de la hemoglobina, 403 – 404, 404f, 406f
fijación, 395 – 402, 514f. See also Bohr effect
Oxihemoglobina, 395f, 402f
Oxitocina, 908, 914t, 916, 917f, 918, 924, 924t, 972
Oxitocina transhidrogenasa, 924f
5-Oxoprolina, 819
$P2Y_1$, purinorreceptor, 323ap
p53, proteína supresora tumoral, 217ap
DNA, estructura, 392f
PABA. *Véase* Ácido *p*-aminobenzoico
Palíndromo, 72
Palmitato
biosíntesis, 699t
transporte de acetil CoA, 701 – 703, 703f
comparación de los esquemas para la, 717t
regulación, 699t, 701
procesos de modificación, 703 – 705
síntesis, 698 – 703
Páncreas, 1084
células β, 865
producción, 888ap
funciones, 1083f, 1084
producción de insulina por el, 889
secreción exocrina en el, regulación celular de la, 1085 – 1086, 1087f
Páncreas, inhibidor de tripsina de, 1041
Pancreozimina, 1087 – 1088. *Véase también* Colecistoquinina
Papaína, 1019
Papovavirus, en vectores de expresión, 311
PAPS. *Véase* 3′-Fosfoadenosina 5′-fosfosulfato
Par conjugado, 9
Paracelular, transporte epitelial, 1088 – 1089, 1089f
Paracetamol, 478
metabolismo del, 478 – 479, 479f, 480ap
Paratiroidea, hormona, 1142, 1144
acciones, 915t
en la osteodistrofia renal, 1143ap
orígenes, 915t
Pared de los capilares, 407 – 408
Pares ácido-base conjugados, 9 – 12, 10t
Pares de bases, 10t, 38, 39f
apareamiento intramolecular en el RNA, 78 – 79, 78f – 80f
procesos cooperativos, 44
Pares redox, 564
Parkinson, enfermedad de, 801ap
Partícula de reconocimiento de señal, 256, 258f
Partículas de ribonucleoproteína, 18
Parvalbúmina, 524
Paseo cromosómico, 308, 308 – 309, 308f
Paso de hélice (p), 113, 113t, 144f
Pasteur, efecto, 599, 619
Patrón entremezclado, 76
Patrones exón-intrón, 383, 384f
Pauta de lectura, 237
PC. *Véase* Proteína C
PCR. *Véase* Reacción en cadena de la polimerasa
PCR anidada, 282
PDE. *Véase* Fosfodiesterasa
Pectinas, 1082, 1127, 1127t
Pelagra, 809, 1151
Pentosa(s), 1172
Pentosas fosfato, 666 – 670, 667f, 669f
Pentosuria
esencial, 674 – 675
idiopática, 675ap
PEP. *Véase* Fosfoenolpiruvato
Pepsina(s), 1082, 1097
Pepsina A, 1097, 1098t
Pepsinógeno, 1097, 1098, 1098t
autoactivación, 1097, 1098
autocatálisis, 1097, 1098
Peptidasa señal, 256, 256 – 257
Peptidasas
en la digestión de proteínas, 1097
gástricas, 1097, 1098t
intestinal, 1099
pancreática, 1098t
Peptidil transferasa, 246
Péptido(s), 95
biológicamente activo, 100t
de conexión, 266
digestión de, 1099
huella de masas, 146
transporte, en células de mamíferos, 528t
transporte epitelial de, 1099
Péptido asociado a la GnRH, 918
Péptido intermediario similar a la corticotropina, 912
acciones, 913t
orígenes, 913t
síntesis, 915, 916t
Péptido liberador de gastrina hipotalámica, 910t
Péptido señal, 256
Péptidos atrionatriuréticos, 950 – 953, 951f
Péptidos C, 109, 110f, 266
Péptidos opiáceos, 913t, 948t
Periferina, mutación del gen de la, y retinitis pigmentosa, 1009ap – 1010ap
Periportal
hepatocitos, 897, 898f
región, 785
Perivenosa, área, 785
Perivenosos, hepatocitos, 897, 898f
Permeasa, 514
Peroxidación lipídica, 591
Peroxidasas, 417
Peróxido de hidrógeno, 22
Peróxido de oxígeno, 590
Peroxisoma(s), 22, 264, 722 – 723, 723f
anomalías de la biogénesis de, 22ap
en el síndrome de Zellweger, 22ap
Peso corporal ideal, 709ap
Petequias, 1158
PGI_2. *Véase* Prostaciclina
pH, 11, 12f, 13ap, 13f
amortiguación, 12 – 14, 13f
en la sangre, 13ap
cálculo, 9
de fluidos biológicos, 9t
intracelular, en la regulación de 6-fosfofructo-1-quinasa, 620 – 622, 620f
isoeléctrico
reacciones de la fosfatasa y, 451f
regulación
relación entre $[H^+]$, $[OH^-]$ y pOH, 9t
sanguíneo, regulación hepática del, 897 – 898
y actividad catalítica enzimática, 450 – 451
y concentración de un ácido y base conjugados, 11 – 12
y forma iónica de un aminoácido, 102
y forma iónica de una proteína, 102
y pI, 104f
y pK'_a ácido, 102 – 103, 102t
pH isoeléctrico, 103
pH óptimo, 451
pH-velocidad, perfil, 451
pI, 103, 103 – 107, 104f, 104t
Picolinato carboxilasa, 809, 809f
Piel, pigmentación de la, 801ap
Piericidina, 575
Pigmentación de la piel, 801ap
Pigmento de desgaste (lipofuscina), 21
Pigmento senil (lipofuscina), 21
Ping-pong, mecanismo, 425, 425 – 426, 425f
Pinocitosis, 20, 273, 1100
Pipecolato, 815, 815f
Piperidina, 285
Pirámide alimentaria del USDA, 1131, 1132f
Piranosa, anillos de, 1173
Piridoxal, 1151
Piridoxal fosfato, 426, 426ap, 783, 783f, 1151
en el metabolismo de aminoácidos, 794
en el metabolismo del triptófano, 810
en la síntesis de hemo, 1067
en una reacción de transaminación, 783f
papeles metabólicos del, 1151 – 1152, 1152f
unido a un residuo de lisina a través de un enlace tipo aldimina, 783f
Piridoxamina, 1151
Piridoxina. *Véase* Vitamina B_6
Pirimidina(s), 29, 29f, 1179
análogos de las, como agentes antivirales, 857
átomos de carbono y nitrógeno en las, fuentes de, 843f
bases, 829f
conformaciones glicosídicas, 32 – 33, 33f
degradación, 846 – 848, 847f
dímeros, 192, 192f
en la aciduria orótica, 826
en la inmunodeficiencia, 826
estructura, 1179
interconversiones, 846, 846f
metabolismo, 825 – 858, 840 – 843, 854 – 858
oxigenadas, 1179
recuperación, 843, 853
síntesis, 435, 840 – 842, 841f
de novo, 853
durante la fase S, 849 – 850
en la aciduria orótica hereditaria, 842ap
regulación, 842 – 843, 843f, 849 – 850
Pirimidina fosforribosiltransferasa, 843
Pirofosfatasa, 649
Pirofosfato, 420
Piruvato, fuentes y destinos metabólicos, 549, 549f
Piruvato carboxilasa, 418, 418f, 559, 560f, 631 – 632, 638 – 639, 1153
Piruvato deshidrogenasa, 549, 1148 – 1149
como complejos multienzimáticos, 549 – 552, 549t, 550f, 551f
complejo de, 640

deficiencia, 552ap
reacción, 636, 701 – 703
regulación, 550 – 552, 551f
Piruvato deshidrogenasa quinasa, 640
Piruvato quinasa, 430, 614, 628
aspectos reguladores, 614, 615f
deficiencia, 628ap
en la glucólisis, 628 – 629
hepática, inactivación, 629f
reacción catalizada por la, 430f, 604f, 609
Piruvilo, grupo prostético, formación de un enzima con, 795f
6-Piruvil-tetrahidropterina sintasa, 837
p*K′*, 9, 10t
Placenta, 891
Plasma
constituyentes químicos, 16f
inmunoglobulinas en, 372ap
lipoproteínas, 127 – 129, 745 – 750, 747f, 748f, 749f
funciones, 747 – 750, 748f
síntesis, 749
y transporte de triacilglicerol, 710 – 712
Plasmalógeno de colina, 498
Plasmalógeno de etanolamina, 498, 498f
Plasmalógenos, 498, 498f, 730, 730f, 1177
síntesis, 740, 740f
Plásmidos, 59, 288
agalla vegetal, 320
clonación de DNA con, 289f
control estricto, 288 – 289
control relajado, 288 – 289
inactivación por inserción de, 293, 294f
pBR322, 289, 289f, 293
pSC101, 289
relajado, 289
Plásmidos de agallas vegetales, 320
Plasmina, 452
y coágulos sanguíneos, 458
Plasminógeno, 458
activador tisular del, 1045
tipo 1, 1045
tipo 2, 1045
recombinante, 378ap
requerido para la fibrinólisis, 1045, 1045f
Plomo, envenenamiento por, 1066t, 1068
Pol III, 173
Pol α/primasa, complejo, 175
Polaridad, DNA polimerasas, 166, 167f
Poliacrilamida entrecruzada, 143
Poliadenilación, precursores de mRNA, 226, 227f
Poliaminas, 66, 792, 807f
Policistrónico, RNA mensajero, 84, 235
Polimerasa(s). *Véase* DNA polimerasas; RNA polimerasa(s)
Polimerasa, reacción en cadena de la, 281 – 282, 281f. *Véase también* Transcriptasa inversa PCR
aplicaciones clínicas, 282
estrategia múltiple, 291, 292f
análisis de defectos en la HGPRTasa en el síndrome de Lesch-Nyhan, 293ap
anidada, 282
frente a clonación, 291, 293
mutagénesis por PCR inversa, 316, 317f
y rastreo del VIH, 282ap
Polímero(s), en los alimentos, 1082 – 1083
Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, 298
y origen clonal de tumores, 299ap
Polimorfismo estructural, doble hélice del DNA, 46
Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla, 298, 300, 300ap
Polimorfismos de un solo nucleótido, 119
Polimorfismos genéticos, 484
estructural, doble hélice del DNA, 46
medicina genómica, 186ap
polimorfismos conformacionales de cadena sencilla, 298, 300, 300ap
polimorfismos de un solo nucleótido, 119
regulación de la expresión del citocromo P450, 484 – 485, 485ap
requerimientos de ácido fólico y, 1155ap
Polinucleosomas, 68, 70
Polinucleótido(s), 34, 1179
antiparalelos, 37
conformaciones, 34 – 35, 34f
doble hélice del DNA, 38 – 40, 38f
estabilidad del esqueleto, 35 – 36, 35f, 36f
estructura, en el DNA, 33 – 36, 33f, 34f
Polinucleótido fosforilasa, 237
Poliol deshidrogenasa, 1005
Polioles, ruta de los, 889ap
Polipéptido(s), 98
estructura de dominios, 117 – 121
cadenas. *Véase* Cadenas polipeptídicas
Polipéptido intestinal vasoactivo, 1087
acciones, 914t
como secretagogo, 1086t, 1087
estructura, 1088t
orígenes, 914t
Poliprolina tipo II, hélice, 123
Polisacárido(s), 1172, 1174 – 1175
extremo no reductor, 1175
extremo reductor, 1175
hidrólisis de, 1100 – 1103
ramificados, 1175
síntesis, 678 – 679
ezimas hidrolizantes de, 20t
POMC. *Véase* Proopiomelanocortina
POP2. *Véase* Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
Porfiria, 1065, 1066t, 1070
Porfiria cutánea tardía, 1066t, 1070
Porfiria intermitente aguda, 1066ap, 1066t
Porfiria jaspeada, 1066t, 1070
Porfirina, 1065, 1066t
Porfirinógeno, 1063, 1063 – 1065
oxidación, 1063 – 1065, 1065f
Porfobilinógeno, 1068, 1068f
Porfobilinógeno deshidratasa, 1069, 1069 – 1070
Porfobilinógeno sintasa. *Véase* Ácido amionlevulínico deshidratasa
Porinas, 516, 519, 563
Poros
de membrana, 512 – 513, 513t, 516 – 518
de la membrana nuclear, 518 – 519
Portal, sistema, 934
Posición degenerada, codones, 237
Potasio, transporte activo, 522
Potencia, golpe de
Potenciadores, 209, 216, 216f, 353, 353 – 354
Potencial de membrana, desarrollo, 515
Potencial de oxidación-reducción, 564
Potencial de reposo, 1010
Potencial eléctrico transmembrana, 516, 991, 992f, 993
Potencial en reposo, 1008, 1011f
Precalicreína, 1035
déficit, 1035ap
Precursores, función como, 827
Pregnano X, receptor, 483
Pregnenolona, 472, 473f
síntesis, 472, 473f
Δ^5-Pregnenolona, en la síntesis de esteroides, 964, 965f
Preproinsulina, 265, 265 – 266
Presbiopia, 1004, 1005t
Presecuencias, 263
Presión sanguínea, 1161
elevada, 984ap
y prostaglandinas, 770
Primasas, 167
Primer orden, reacciones de, 419
Primera ley de la difusión de Fick, 512
Procarcinógenos, 192
Procariotas
definición, 4, 5f
DNA, 73, 74f
empaquetamiento, 66 – 67, 66f
organización, 5f
replicación del DNA, 173 – 175, 174f
transcripción, 211 – 214
Procedimiento Sanger, secuenciación de DNA, 285 – 287, 286f, 288f
Procesos (mecanismos) procesivos, replicación del DNA, 172
Procesos cooperativos, apilamiento de bases, 44
Procesos distributivo, replicación del DNA, 172
Procesos semiconservativos, 135f
Procolágeno, formación, 268 – 269
Producto iónico del agua, 8
Proenzimas, 382, 1085 – 1086
Proflavina, 193
Progestacionales, hormonas, 960, 960, 963
Progesterona, 472, 960, 964
acciones, 934
colesterol como precursor, 742
estructura, 961t
funciones, 961t
hidroxilación de, 417f
receptores de, 976
rutas de excreción, 968t
secreción, 961t, 969t, 971f
síntesis, 964, 969t, 971f
Prohormonas, 924
Proinsulina, 109, 110f, 266
Prolactina, 912, 913t
factor inhibidor de la liberación de, 910t, 913t
factor liberador de, 910t, 913t
Prolina, 97, 792, 792f
Promotores, 208, 333
reconocimiento, 211 – 212, 213f, 214f
Proopiomelanocortina, 915, 916f, 916t, 917f
gen, 977 – 978
Propionato, 636 – 637, 637, 637f, 898
gluconeogénesis a partir de, 637f
metabolismo, enfermedades, 814ap
Propionil CoA, 717, 717f, 812
interconversión, 814f
metabolismo, 812
producción, 717
Propionil-CoA carboxilasa, 812, 1153
deficiencia de, 814ap
Proporción PUFA/SFA, 1128, 1129, 1129ap
Proporcionalidad, constante de (*k*), 420
Proproteína, 269
Proquiral, sustrato, 443
Prostaciclina, 948t, 1041
Prostaglandina(s), 432ap, 766 – 770, 1176
efectos fisiológicos, 770
estructura, 766 – 767, 766f, 767f, 1176
inhibición de la producción, 978
PGI_2, 1129ap. *Véase también* Prostaciclina
PGI_3, 1129ap
síntesis, 767 – 770, 767f – 769f, 1126 – 1127
inhibición por agentes antiinflamatorios, 769 – 770, 770f
vida media, 769
Prostaglandina G/H sintasa, formas, 768 – 769
Protanopía, 1016

Proteasa del HIV
  estructura, 150f
  representación estereoscópica de la estructura, 150f
Proteasa-inhibidor, complejo, 1041
Proteasas, 377-387, 1097
  aspartato, 378
  cisteína, 378
  con zinc, 428
  metalo, 378
  serina. *Véase* Serina proteasas
Proteasomas, 272
Protección frente a la DNasa, 336
Protein data bank, 149
Proteína(s), 95
  absorción de, 1097 – 1100, 1097f
  ácida, 101 – 102, 101t, 102
  asociada a la resistencia multifármaco, 525
  básica, 101 – 102, 101t, 102
  bioinformática y, 117 – 120
  carga, separación basada en la, 140 – 143
  cerebro, velocidad de recambio en el, 991
  chaperona, 133
  clases, 118
  clases de plegamiento, 118
  composición, 93 – 153
  con anclas de glucosil fosfatidilinositol, 507, 507t
  con múltiples dominios, 116, 116 – 117, 118f
  concentración estacionaria, 139f
  concentraciones celulares, 139, 139f
  conformación nativa, 112
  constante de disociación (K'_a), 101 – 102, 101t, 102t
  deficiencia, 863ap
  degradación, 786 – 787
  desnaturalización, 1097
  desnaturalizada, 138 – 139
  determinación proteómica de, 144 – 146
  digestión de, 1097 – 1100, 1097f
  dominios globulares, 118f
  enlaces glucídicos, 132, 132ap, 132f
  enlaces glucosídicos a aminoácidos en, 132f
  enzimas hidrolizantes de, 20t
  equilibrio ácido-base y, 102 – 103
  estabilidad, 132 – 139
  estructura, 93 – 153, 139 – 140
    caracterización, 140 – 153
    conformación, 133
    determinación espectroscópica, 150 – 152
    energía de enlace, 136t
    estabilidad, 132 – 139
    estudio, 140 – 153
    flexibilidad dinámica, 148
    fluctuación, 136t
    mRNA, 84 – 85, 84f, 85f
    purificación, 140 – 153, 144
  estructura cuaternaria, 112, 121
  estructura primaria, 98, 109, 111 – 112
  estructura secundaria, 112, 113f, 115
  estructura terciaria, 112, 116 – 117, 117f
  estructura α helicoidal, 114 – 115
  estructura β, 115, 115f
  familia de, 118, 368
  forma iónica, 102
  fosforilación-desfosforilación, 943 – 945, 945f
  frataxina, 1057ap
  función, 94 – 95
  glucoproteínas P, 525
  glucosilación, 257, 257 – 261, 258t, 259f – 261f
  glucosilación, 875ap
  grupos ácidos comunes, pK'_a, 101t, 102t
  grupos ionizables y función biológica, 101 – 109
  importación por las mitocondrias, 262 – 264
  inhibidores, 382 – 383, 383t
  inhibidores de serina proteasas, 382 – 383, 383t
  masa molecular o tamaño, separación basada en, 142 – 143
  membrana, 506
    difusión, 509 – 511
    distribución, 507
    integral (o intrínsecas), 502, 505 – 507, 506f
    movilidad, 511 – 512, 511f
    periféricas (o extrínsecas), 502, 507
    segmento transmembrana, 506, 506f
  modificaciones postraducción, 255 – 261, 266
    ausencia, 267ap
    biosíntesis de colágeno, 268 – 270, 269f
    destino a membranas y orgánulos, 262 – 265, 263f, 264f
    glucosilación, 257 – 261, 258t, 259 – 261f
    modificación de aminoácidos, 266 – 268, 267t, 268f
    plegamiento de proteínas, 255 – 256
    proteólisis parcial, 265 – 266, 265f
    ruta secretora, 256 – 257, 256f, 258f
  niveles superiores de organización, 112 – 121
  plasma, coeficientes Svedberg, 142t
  plegamiento (interacciones no covalentes), 132 – 139, 135f
  plegamientos, 115 – 116, 116
  propiedades químicas, 101 – 109
  proteólisis, 272 – 274
    dependiente de ATP, 272 – 273, 272f, 273f
    digestión intracelular, 273
  recambio, 781, 1119
  reguladoras de la transcripción, motivos comunes, 354 – 357, 355f – 357f
  relaciones estructura-función, 367 – 409
  secreción, por el aparato de Golgi, 18 – 19
  secuencia de aminoácidos, 95 – 100, 95f
    determinación, 146 – 148, 146ap, 147f, 148f
    reactivos de corte, 147, 148f
  serina proteasas, inhibidores, 382 – 383, 383t
  síntesis, 233 – 274, 891 – 892. *Véase también* Traducción
    elongación, 246, 248f – 249f, 250 – 251, 252f
    en *Escherichia coli*, respuesta estricta, 344 – 345, 345f
    inhibición por antibióticos y proteínas, 254 – 255, 254t, 255f
    iniciación, 245 – 246, 247f
    mitocondrial, 251 – 252, 254
    rRNA, 83 – 84, 83f
    terminación de la síntesis de polipéptidos, 251, 253f
  superfamilia, 377, 377f
  superplegamientos, 119
  transporte
    aptas, 262
    con destino a orgánulos, 262 – 265, 263f, 264f
  trifuncionalismo, 715
  valores pI, 104t, 105 – 106
  y dogma central de la biología molecular, 28, 28f
Proteína A de replicación, 175
Proteína activadora de catabolitos, 335f, 336 – 337, 337
Proteína Arnt, 483
Proteína C, 1043, 1043 – 1045, 1044f, 1047
  alteraciones de la ruta de la proteína C, 1044ap
  inhibidor de la, 1044, 1044 – 1045
Proteína de fijación de andrógenos, 974
Proteína de iniciación, 177
Proteína de intercambio aniónico, 519 – 520
Proteína de la regulación esteroidogénica aguda, 963f, 964, 967
Proteína de mantenimiento del minicromosoma (MCM), 177, 177 – 178
Proteína desacopladora, 521
Proteína ferrosulfurada de Rieske, 570
Proteína globular, 118f, 121, 151f
Proteína OB, como fármaco antiobesidad, 862ap
Proteína multifuncional, 830
Proteína que une heparina, 1040, 1040 – 1041
Proteína quinasa(s), 551
  A, 624, 626, 879 – 880, 927f, 928
  C, 931, 943
    activación, 931
    estimulación, 970
    subespecies, 949f, 950
  dependiente de cAMP, 996
  dominios catalíticos, 944, 944f
  M, 950
  y acción hormonal, 943 – 953
Proteína quinasa A, 440
  ruta de la, 927f, 928, 928f, 929f, 943, 945 – 948, 948t
Proteína quinasa C, ruta de la, 943, 948 – 950, 948t
Proteína quinasa dependiente de cAMP, 996. *Véase también* Proteína quinasa A
Proteína quinasa G, ruta de la, 943, 950 – 953
Proteína receptora de cAMP, 337
  control de *lac*P por, 337 – 338
  y represión por catabolito, 337 – 338
Proteína reguladora, sitio de reconocimiento, en la secuencia del promotor del operón lactosa, 335f, 336 – 337
Proteína represora, 346
Proteína S, 1043, 1047
Proteína supresora tumoral p53, 217ap
Proteína tirosina quinasas, 273
Proteína transportadora de acilo (ACP), 700
Proteína Z, 1042, 1047
Proteínas aptas, transporte, 262
Proteínas alostéricas, 337
Proteínas asociadas a la resistencia multifármacos, 525, 858
Proteínas bZIP. *Véase* Proteínas con región básica-cremallera de leucina
Proteínas con hierro no hemo, 430, 1054
Proteínas con homeodominios, 354
Proteínas con región básica-cremallera de leucina, 355 – 356, 356f
Proteínas de anclaje, 256
Proteínas de fusión, 309
Proteínas de la dieta, 1082, 1119
  absorción, 1097 – 1100, 1097f
  contenido energético de (kcal), 1118
  contribución al suministro diario de nutrientes, 1082, 1082t
  de origen animal, 1120 – 1121, 1130 – 1131
  de origen vegetal, 1120 – 1121, 1130 – 1131
  digestión de, 1097 – 1100, 1097f
  en las dietas vegetarianas, 1121, 1121ap
  ingestión, 1082t
    exceso, 1123 – 1125
    media en Estados Unidos, 1122 – 1124
    recomendada, 1122, 1130 – 1131
    y necesidades de calcio, 1124
  metabolismo, 1119 – 1123
  requerimientos, 1119
    en enfermedades y recuperación de pacientes, 1122 – 1123, 1123ap, 1124
    mezcla de proteínas animales y vegetales para satisfacer los, 1130 – 1131

relacionados con el crecimiento, 1122 – 1123
y dieta, 1122
y enfermedad renal, 1121ap
y producción de energía, 1119
Proteínas de los músculos, mutaciones, en cardiopatías hipertróficas familiares, 1019ap
Proteínas de unión a DNA, 368, 387 – 393, 388f
motivos estructurales, 387 – 390
Xfin, motivo dedo de zinc de, 389f
Proteínas de unión a GTP, 997
Proteínas de unión a TATA, 351, 351f, 391f
Proteínas de unión al calcio, motivo hélice-bucle-hélice, 524, 525f
Proteínas de unión al casquete, 246
Proteínas de unión al DNA, 301 – 302
Proteínas de unión al elemento de respuesta a cAMP, 641
Proteínas de unión específica a DNA de cadena sencilla, 169, 173 – 174
Proteínas del complemento, 371ap
Proteínas desacopladoras, 586 – 587, 587f
Proteínas encajadoras, 180
Proteínas ferrosulfuradas, 430, 567
Proteínas ferrosulfuradas citosólicas, 1057ap
Proteínas fibrosas, 121 – 126
Proteínas fijadoras de ATP, 525 – 526
Proteínas fijadoras del hierro, 1054
Proteínas G, 925, 925, 927, 927t
subunidades, 925
Proteínas hélice-giro-hélice, 354, 355f, 387, 388f, 979
Proteínas hélice-lazo-hélice, 357, 357f
Proteínas hemo, 1054 – 1056
Proteínas heterotetraméricas, 1012
Proteínas H-NS, 66
Proteínas HU, 66
Proteínas mecanoquímicas, 22
Proteínas oligoméricas, interacción entre centros de unión de ligandos, 438 – 441
Proteínas periféricas (o extrínsecas), en membranas, 502, 507
secuencia de aminoácidos hidrofóbicos como ancla, 506f, 507
unión, 507 – 508
unión a proteína integral, 506f, 507
unión electrostática, 506f, 507
Proteínas plasmáticas, análisis electroforético, 106f, 107ap, 107f
Proteínas que contienen γ-carboxiglutamilo, 1034
Proteínas que contienen Gla, 1046, 1046f
síntesis, 1048f, 1049
Proteínas que contienen hemo, 1054 – 1056
Proteínas que contienen hierro, 1054 – 1056
Proteínas reguladoras de hierro, 1059
IRP-1, 1059, 1059f
IRP-2, 1060
Proteínas ribosómicas, 343
operón de *E. coli*, 343 – 344, 343f
síntesis, 343 – 344, 344, 344f
Proteínas SNARE, 262
Proteínas transportadoras con caset fijadora de ATP, 525 – 526
Proteínas trifuncionales, 715
Proteínas visuales, 1141
Proteoglucanos, 683 – 688
aplicaciones clínicas, mucopolisacaridosis, 688ap
estructura, 683 – 684
funciones, 684
síntesis, 685f, 688
Proteolípidos, 502
Proteólisis, 272 – 274
dependiente de ATP, 272 – 273, 272f, 273f
digestión intracelular, 273
parcial, 265, 265 – 266, 265f
Proteómica, 324
técnicas, 144 – 146
Protómeros, 437
Protooncogenes, 952, 979 – 982
Protoporfiria eritropoyética, 1066t
Protoporfiria hereditaria, 1066t
Protoporfirina IX, 395, 466, 1054, 1065
Protoporfirinógeno, conversión a porfirina, 1063 – 1065, 1065f
Protoporfirinógeno IX oxidasa, acción, 1065f , 1070
Protransglutaminasa, 1038
Protrombina
activación, 1146
carboxilación, 1146 – 1147
PS. *Véase* Proteína S
Pseudogenes, 76
Pseudoprimer orden, reacciones de, 420
Pseudouridina, 1179
Puentes de hidrógeno, 6 – 7, 137, 137f, 1171
de moléculas de agua, 6 – 7, 6
energía de enlace, 136t
especificidades, 39
representativos, 7f
tRNA, 81, 81f
PUFAs. *Véase* Ácidos grasos, poliinsaturados
PUFA/SFA, proporción, 1128, 1129, 1129ap
Pulmones, dipalmitoil-lecitina y función de los, 730 – 732, 731f
Punto isoeléctrico, 1179
Puntual, mutación, 192
Purina(s), 29, 29f, 825 – 858, 1179
análogos de las, como agentes antivirales, 857
estructura, 828f
recuperación, 853
conformaciones glicosídicas, 32 – 33, 33f
degradación, 837 – 839, 838f
en el síndrome de Lesch-Nyhan, 826
en la gota, 826
enzimas, 849 – 850
estructura, 1179
interconversión, 835 – 836, 836f
metabolismo, 825 – 858, 830 – 840, 854 – 858
oxigenadas, 1179
principales derivados en las células, 828 – 830
síntesis, 435, 830, 1154
de novo, 830, 835 – 836, 856f
regulación, 833 – 834, 833f
sobreproducción, 833 – 834
Purinorreceptor $P2Y_1$, 323ap
Puromicina, inhibición de la síntesis de proteínas, 255, 255f
Putrescina, síntesis, 793f
PZ. *Véase* Proteína Z
Queilitis, 1148
Quelación, modos, 429
Quelatos, 428, 429
Quemaduras, efectos metabólicos, 892
Queratán sulfato, 685f, 686
Queratina, 1141
α-Queratina, 126, 126f
Quernícteno, 1072
Quilomicrones, 127, 711, 864, 865, 1108 – 1110
Quimioterapia
ácido úrico y, 840ap
agentes quimioterápicos, 854 – 858
del cáncer de mama, 955ap
Quimotripsina, 147, 446, 447f, 1098t, 1099
α-Quimotripsina, 151f, 380t
Quinasa de cadena ligera de miosina, 1031
Quinasa dependiente de RNA de doble hebra, 271, 271 – 272
Quinasa inhibidora regulada por hemo, 271
Quinasas, 417, 430f, 848
Quinasas específicas de tirosina, 943
Quinesina, 22
Quiniógeno de elevada masa molecular, 1035, 1038, 1038 – 1039, 1040f
Quinolinato, como neurotransmisor, 810
Quinoproteínas, síntesis, 801 –802
Quinuramina, 810
Quinurenina formamidasa, 809f
Quinurenina hidroxilasa, 809, 809f
Quinureninasa, 809f, 810
Quiral, compuesto, 443
R (rectus), 1172
Rab3, 997
Racemasas, 418, 418f
Radical hidroxilo libre, 590
Radicales de oxígeno, 590
Radicales libres. *Véase* Especies reactivas de oxígeno
Rafinosa, 1101t, 1103
Ratón
genosuprimidos, 321, 321 – 323, 322f, 323ap
transgénico, 321 – 323
Rayos X
cristalografía, 386t, 388f, 396, 962f
difracción de, 148, 381f
Razón P/O, 578
transporte electrónico mitocondrial y fosforilación oxidativa, 578
Reacción(es)
anaplerótica, 559, 559 – 560, 560f, 634
catalizadas por enzimas
curva de saturación de sustrato, 422, 422f
curvas de progreso, 419f
mecanismo, 444 – 445
velocidad inicial (v_1), 419, 422, 422f
catalizadas por RNA, 250
de alargamiento, 703 – 705
sobre ácido graso sintasa de mamíferos, 702f
de desalquilación, 471
de deshalogenación, 471
de Edman, 147, 147f
de la glutamato-piruvato aminotransferasa, 782f
de orden cero, 420
de oxidación-reducción, 416, 564-565, 1171
de primer orden, 419
de pseudoprimer orden, 420
de remodelado, distribución asimétrica de ácidos grasos en los fosfolípidos, 738 – 740, 739f, 740f
de segundo orden, 420, 421
de van den Bergh, 1073
del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, 553 – 557, 554f, 556f
anaplerótica, restablecimiento de intermediarios, 559 – 560, 560f
distante del equilibrio, 614 – 615
en cadena de la polimerasa. *Véase* Polimerasa, reacción en cadena de la
endergónica, 541
energía libre, 541 – 542, 542t
reacciones enzimáticas acopladas, 545
redox, 565 – 566
estereoespecificidad, 427
exergónica, 541
glutamato-piruvato aminotransferasa, 782f
orden de, 419
concentración de sustrato como función de, 453f

próxima al equilibrio, 614 – 615
pseudoprimer orden, 420
redox, 416, 1170 – 1171
reversibilidad, 420 – 421
sustitución nucleofílica, 1171
tipos, 1171
van den Bergh, 1073
velocidad de, 414, 418 – 419, 418 – 420, 420 – 421, 421f
vida media ($t_{1/2}$) de una, 420
Reacciones químicas. *Véase* Reacción(es)
Reactivos de grupo sulfhidrilo, inhibición de la glucólisis por, 613, 613f
Reactivos de la fase aguda, 892
RecA, 190
RecBCD, 190
Receptor(es). *Véase también* Interacciones hormona-receptor
celulares, 906, 906f
estructura, 940 – 941
funciones, oncogenes y, 452 – 453
mitocondrial, 264
Receptor activado α de la proliferación de peroxisomas, 484
Receptor Ah, 980
translocador nuclear del, 483
Receptor arilhidrocarburo, 482
Receptor constitutivo de androstano, 483
Receptor de angiotensina, 967, 970f
Receptor de glucocorticoides, 977
Receptor de hidrocarburos arílicos, 477, 980
Receptor de insulina, sustrato-1 del, 944
Receptor de la acetilcolina, 518, 1025. *Véase también* Canal nicotínico de la acetilcolina
Receptor de la hormona tiroidea, 979, 981
Receptor de trombina, 1039
Receptor del factor atrionatriurético
dominios funcionales, 950, 951f, 952f
sistema guanilato, 950
Receptor H_2, análogos de la histamina que actúan como antagonistas en el, 1086
Receptor nicotínico de la acetilcolina, 516, 993
Receptor pregnano X, 483
Receptor ribosómico, 256
Receptor X de retinoides, 483
Receptores de ácido retinoico, 979, 980f, 981
Receptores de aldosterona, 960
Receptores de cortisol, 960
Receptores de estrógenos
alfa (ERα), 976
beta (ERβ), 976
unión al tamoxifeno, 358ap
Receptores de glicina, 993
Receptores de glucagón, 626
Receptores de hormonas esteroides, 974 – 982
Receptores de hormonas esteroides nucleares
coactivadores, 983, 984f
correpresores, 983, 984f
Receptores de insulina, 944, 944 – 945
Receptores de mineralocorticoides, 977
Receptores de progesterona, 976
Receptores de transferrina, 1055, 1060f
Receptores específicos, 906
Receptores esteroides, autorregulación de, 983
Receptores huérfanos, 982
Receptores retinoides X, 979, 980f
Receptores α-adrenérgicos, 658
Receptores β-adrenérgicos, 626, 658, 940 – 941, 940f, 941f
Receptosomas, 941
Recombinación del DNA. *Véase* DNA, recombinación
Recombinación general, 186
Recombinación homóloga, 186, 188 – 190, 321
modelo de corte de doble cadena, 189 – 190, 189f
modelo de Holliday, 186, 187f, 188
modelo de Meselson-Radding, 188 – 189, 188f, 189
Recombinación ilegítima, 191
Recombinación no homóloga, 186, 190 – 191
específica de sitio, 190
ilegítima, 191
transposición, 190 – 191
Reconocimiento, en el transporte a través de membranas, 514, 514f
Recuperación, en el transporte a través de membranas, 515
Redox, reacciones, 416, 1170 – 1171
Reducción, 1171, 1176. *Véase también* Reacción(es), de oxidación-reducción
5α-Reductasa, 964, 967
Reductores, 564, 1057
Refinamiento, 149
Refsum, enfermedad de, 694, 719ap
Regaliz, 977ap
Regiones constantes, 371
Regiones determinantes de la complementariedad, 370 – 371
Regiones hipervariables, 370
Regiones ricas en CG, 349
Regiones variables (V), 370
Regulación cruzada de enzimas, 460, 460f
Regulación esteroidogénica aguda, proteína de la, 963f, 964, 967
Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, 525 – 526, 525f, 1093ap
activación, 1094ap
Regulón, 202, 202 – 203, 203f
Relación de Lambert-Beer, 453 – 454
Relajado, DNA, 60, 61
Relaxina, 914t
Remodelado, reacciones, distribución asimétrica de ácidos grasos en los fosfolípidos, 738 – 740, 739f, 740f
Renaturalización, 43
DNA, 43 – 44, 44f
Renina, 967
Renina-angiotensina, sistema, 967, 971f
Renutrición, estado temprano, 869 – 870, 870f
Reordenamiento de azúcares, sistema de, 668, 669f
Reorientación, 260
REP (elementos palindrómicos extragénicos repetidos), 73
Reparación a pequeña escala, 195
Reparación de apareamientos erróneos, 197, 197 – 198, 198f
y cáncer, 198ap
Reparación de huecos en la hebra hija, 200, 200 – 201, 201f
Reparación por escisión de, 194, 194 – 196
base, 194, 194 – 195, 194f
nucleótido, 195 – 196, 195f
Reparación por escisión de base, 194, 194 – 195, 194f
Reparación por escisión de nucleótido, 195 – 196, 195f
Repetición, secuencias de DNA, 75 – 77
Repeticiones entremezcladas cortas, 76
Repeticiones entremezcladas largas, 76
Repeticiones invertidas terminales, 345
Replicación, bidireccionalidad de la, 177
Replicación, origen de, 67
Replicación semiconservadora, 162, 162 – 163, 163f
Replicones, 289
Replisomas, 173, 173f
Reposición de electrolitos, terapia para la diarrea, 1094ap
Represión, 338
Represión por catabolito, 337f, 338
Represor lactosa, 333 – 335
Represor triptófano, 339
Reproducción, prostaglandinas y, 770
Resfriado común, 1158 – 1159
Residuo R_i, 113f
Resinas de intercambio aniónico, 141
Resinas de intercambio catiónico, 140
Resistencia a antibióticos
selección de bacterias por pérdida de, 293 – 296
transposones que contienen genes de, 346ap, 347
Resistencia a la insulina, 885 – 886
Resistencia a fármacos. *Véase también* Resistencia multifármacos
base biológica para la, 857 – 858
Resistencia específica a fármacos, 858
Resistencia multifármacos, 858
transmisible, 346ap
Resonancia magnética nuclear, bidimensional, 152 – 153, 153f
Respuesta catabólica, 1122
necesidades proteicas y energéticas en la, 1122 – 1123, 1123ap
Respuesta estricta, 344 – 345
Respuesta SOS, 202, 202 – 203, 203f
Restricción topológica, 174
Retículo endoplasmático, 18, **18**
flavoproteína donadora de electrones, 468 – 469, 469f
hidroxilasas, en la síntesis de esteroides, 964
Retículo endoplasmático liso, 18
Retículo endoplasmático rugoso, 18, 256, 256
Retículo sarcoplasmático, 659, 1016
Retina, 1003, 1005
bastones y conos, segmentos externos, 1006
fuente de ATP, 1005 – 1006
metabolismo glucídico en la, 600
Retinal, 1139, 1140 – 1141
Retinil fosfato, 1140 – 1141
Retinitis pigmentosa, 719ap
mutación en el gen de la periferina, 1009ap – 1010ap
y enfermedad de Niemann-Pick, 1007ap
Retinoides, receptor X de, 483
Retinoides X, receptores, 979, 980f
11-*cis*-Retinol, 1007, 1008
Retinol, 1139 – 1141
equivalentes de, 1140
Retraso mental, 790ap, 795ap
Retroalimentación, bucles, en cascadas de hormonas, 909, 909 – 910, 909f
Retroestimulación de la secreción hormonal, 934
Retroinhibición, 338, 460, 460f
en cascadas de hormonas, 909, 909f
en la síntesis de glucógeno, 657
Revestimiento endotelial, 1033
Reye
síndrome de, 869, 869ap
síndrome parecido al de, 716ap
RFLP. *Véase* Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
Riboflavina, 426, 1150 – 1151
deficiencia, 1150 – 1151
en el alcoholismo, 1150 – 1151
formas coenzimáticas, 427
Ribonucleasa. *Véase* RNasa
Ribonucleoproteína, 242
partículas, 18

Ribonucleósido(s), 30, 30f
Ribonucleósidos difosfatos, reducción, en la síntesis de desoxirribonucleótidos, 843 – 848
Ribonucleótido(s)
  concentraciones en las células, 827
  en la síntesis de 2′-desoxirribonucleótido, 844f
  purínicos, síntesis *de novo*, 831f
Ribonucleótido reductasa, 845f
Ribonucleótidos purínicos, síntesis *de novo*, 831f
Ribosa, estructura, 1172
Ribosa isomerasa, 668
Ribosoma(s), 18, 242, 330, 343
  estructura, 242, 243f, 244 – 245, 244f
  libres, 245f
  organización, 244f, 245
  región decodificadora, 247
  síntesis de proteínas, 242, 243f – 245f, 243t, 244 – 245
  unidos a membrana, 245f
Ribozimas, 28, 86 – 88, 87f, 88f, 250
Ribulosa, estructura, 1172
Ribulosa 5-fosfato
  interconversión, 669
  isomerización, 668
  síntesis, 668
  sistema de eliminación para la, 668
Rieske, proteína ferrosulfurada de, 570
Rifampicina, 210
Rifampina, 483
Rigor mortis, 1028
Riñón(es)
  en el metabolismo del nitrógeno, 787, 791
  función, 896 – 897
  médula, metabolismo glucídico en la, 600
RNA, 18, 28, 77 – 89
  aptámeros, 88, 88 – 89, 88f
  en partículas de ribonucleoproteínas, 86
  estructura, 78 – 82, 78f
    apareamiento de bases intramolecular, 78 – 79, 78f – 80f
    lazo, 226, 226f
    terciaria, 79 – 82, 80f, 81f
  exportación desde el núcleo, 228
  maduración (modificación), 220 – 228
    corte y empalme alternativos para la producción de múltiples proteínas, 227, 228f
    mRNA, 222 – 223, 224f
    mutaciones que causan enfermedades, 227, 227f
    RNA polimerasa II, 223, 225 – 227
    rRNA, 221, 223f
    tRNA, 221, 222f
  reacciones catalizadas por, 250
  recambio y nucleasas, 229 – 230
  replicación de genomas de RNA, 183 – 184
  sondas de, 295, 296 – 297
  tipos, 77, 77t, 82 – 89
  y dogma central de la biología molecular, 28, 28f
RNA antisentido, 318
RNA catalítico, 86 – 88, 87f, 88f
RNA citosólico pequeño (scRNA), 77t
RNA de transferencia, 77, 77t
  adiciones, 221
  aminoacilación, 239 – 242
  corte, 221, 221f
  especificidad y fidelidad de las reacciones, 240 – 242, 242f
  estructura en hoja de trébol, 79, 80f, 83
  estructura terciaria, 80 – 82, 80f
  funciones, 82
  miopatías mitocondriales debidas a mutaciones de genes, 589ap
  nucleósidos modificados, 221
  puentes de hidrógeno, 81, 81f
  síntesis, regulación, 344 – 345
  traducción, 235
RNA hibridasa, 167
RNA mensajero, 77, 77t, 95f
  corte y empalme
    múltiples proteínas a partir de una única secuencia de DNA codificadora, 227, 228f
    mutaciones que causan enfermedades, 227, 227f
  corte y empalme alternativo, 265
  detección de, 300 – 302
  elementos de respuesta al hierro en el, 1059 – 1060, 1060t
  eliminación de intrones desde los precursores, 225 – 226, 225f, 226f
  en la construcción de genotecas de cDNA, 302
  enriquecimiento, 302 – 303
  estructura de las proteínas, 84 – 85, 84f, 85f
  maduración, 222 – 223, 224f
  policistrónico, 330 – 331
  reconocimiento de codones, 82
  síntesis
    defectos que causan la talasemia, 224ap
    promotores, 216 – 217
  traducción, 234 – 235
  traducción direccional y colineal, 245
  transferencia Northern y, 300
RNA monocistrónico, 84
RNA mitocondrial, 77t, 85
RNA nuclear heterogéneo, 77t
RNA nuclear pequeño (snRNA), 77t
RNA policistrónico, 84
RNA polimerasa(s), 163, 333
  reclutamiento de enzimas durante la transcripción eucariótica, 223, 225 – 227
  sitio de reconocimiento, en la secuencia del promotor en el operón lactosa, 335f, 336 – 337
RNA polimerasa I, 218, 218f
  RNA polimerasa II, 216 – 217
  RNA polimerasa III, 218 – 219, 219f
RNA polimerasa I, 347
RNA polimerasa II, 216 – 217, 347, 351, 352f, 353
RNA polimerasa III, 218 – 219, 219f, 347
RNA ribosómico, 77, 77t
  maduración, 221, 223f
  síntesis, 344 – 345
  síntesis de proteínas
RNasa, 445f
RNasaH, 167, 175
RNPs. *Véase* Ribonucleoproteínas, partículas
Rodanasa, 808
Rodopsina, 1007, 1008, 1008f
  activa, 1010, 1012
Rodopsina quinasa, 1013
Rotenona, 575
Rotor, síndrome de, 1075ap
Rotura de cadena lateral, del colesterol, 963
Roturas de cadena doble, 202
Rous, virus del sarcoma de, en vectores de expresión, 311
RPC. *Véase* Factor C de replicación
rRNA. *Véase* RNA ribosómico
Rubenstein-Taybi, síndrome, 349ap
Ruta de la proteína quinasa A, 927f, 928, 928f, 929f, 943, 945 – 948, 948t
Ruta de la proteína quinasa C, 943, 948 – 950, 948t
Ruta de la proteína quinasa G, 943, 950 – 953
Ruta de las pentosas fosfato, 666 – 671, 670f, 1149, 853
  distribución, 671 – 673
  fases, 666
  unión reversible con la glucólisis, 668
Ruta de los polioles, 889ap
Ruta del ácido glucurónico, 603
Ruta del BPG, 608f
Ruta del complemento, clásica, 371ap
Ruta del factor de contacto. *Véase* Ruta intrínseca
Ruta del factor tisular. *Véase* Ruta extrínseca
Ruta del fosfatidilinositol, 948 – 950, 948t
Ruta del 6-Fosfogluconato. *Véase* Ruta de las pentosas fosfato
Ruta extrínseca, 1032
  inhibición, 1041 – 1042, 1042f, 1043f
  iniciación de la coagulación, 1033 – 1034
Ruta intrínsecas, 1032
  defectos, 1035ap
  reacciones de la, 1033f, 1034 – 1039
RuvA, 190
RuvB, 190
S (sinister), 1172
S, fase, 178
S-1, 1019, 1021f
Sacaridasa, 1102, 1103t
Sacaropina, 815
Sacarosa, 1101t, 1103t, 1175
Sacarosa/isomaltasa, 1085t
Sal(es)), 6, 1175
Sales biliares, 1105
  colesterol como precursor, 741 – 742
  deficiencia, 1142ap
SAM. *Véase* S-Adenosilmetionina
Sandhoff-Jatzkewitz, enfermedad de, 683ap, 763t
Sanfilippo, 688ap
Sangre
  acetona en, 722
  coagulación. *Véase* Coagulación sanguínea
  concentración de bicarbonato en la acidosis metabólica, 13ap
  eliminación de fármacos de la, 420
  enzimas, vida media corta, 459
  hemoglobina. *Véase* Hemoglobina
  glóbulos blancos. *Véase* Leucocitos
  glóbulos rojos. *Véase* Eritrocitos
  método de secuenciación de DNA, 285 – 287, 286f, 288f
  transporte de hormonas esteroides en la, 973 – 974
α-Sarcina, inhibición de la síntesis de proteínas, 255
Sarcómeros, 1016, 1017 – 1018, 1017f, 1019t
SCAP, 359, 359 – 360, 360f
Scatchard, análisis, 937, 938f
Schiff, base de, 783 – 784, 783f
Schwann, Theodor, 1082
scRNA. *Véase* RNA citosólico pequeño
Secosteroides, 972, 972f
Secreción ácida gástrica, prostaglandinas y, 770
Secreción de fluidos en el epitelio intestinal, 1092 – 1093, 1092f
Secreción exocrina, 1085
  de enzimas digestivos, 1085, 1086f
Secreciones mucosas, inmunoglobulinas en, 372ap
Secretagogos, 1085, 1086t
Secretina
  acciones, 914t
  como secretagogo, 1086t, 1088
  estructura, 1088, 1088t
  orígenes, 914t
Secuencia AUG, 235, 235 – 236
Secuencia conductora, 340f, 341, 342, 342f

Secuenciación simultánea, estrategia, 324
Secuencial, marco sin solapamiento, 236
Secuencias conservadas, 209
Secuencias de DNA repetidas, 75, 75 – 76
Secuencias de DNA repetitivas, 75, 76 – 77
Secuencias de inserción, 190, 190 – 191
Secuencias de replicación autónoma (ARS), 177
Secuencias semimetiladas, 197
Sedoheptulosa, formación, 668
SFAs. *Véase* Ácidos grasos, saturados
Segundo mensajero, 623
Segundo orden, reacciones de, 420, 421
Segundos mensajeros, 494, 524, 659, 907, 928 – 931
Selenio, 1163 – 1164
Selenocisteína, 794, 794f
Semialdehído del ácido glutámico, 792, 792f
Semialdehído α-amino adípico sintasa, 816ap
Semimetiladas, secuencias, 197
Semisilla, conformación, 446f
Señal de destino a la matriz mitocondrial, 263, 263 – 264
Señal de inicio, traducción, 234, 235, 235 – 236
Señal de paro, traducción, 236
Señales de localización nuclear, 264
Sepiapterina reductasa, 837
Serina, 97, 680 – 681, 682f, 793 – 794
  en las rutas de la proteína quinasa, 943
  hidroximetiltransferasa, 795f
  secuencias invariables, 385t
  síntesis, 793, 793f, 1154
Serina deshidratasa, 784f, 793, 793f, 797
Serina proteasas, 368, 377, 378f
  deficiencia, 379t
  en la metástasis celular tumoral, 379ap
  especificidad hacia determinados enlaces, 380t, 381 – 382, 381f, 382f
  estructura, 382f, 385 – 387, 386t, 387t
  inhibidores, 382 – 383, 383t
  mal funcionamiento, 378ap, 379t
  mecanismo de catálisis covalente, 446, 448
  papel de, 379t
  patrones exón-intrón, 383, 384f
  relaciones estructura función, 383 – 384
  secuencias de aminoácidos, 383 – 384
  zimógeno, 381 – 382
Serotonina, 810 – 811, 893 – 894, 1001, 1001f, 1087, 1087f
  como secretagogo, 1086t, 1087
  estructura, 1087f
  productos de excreción urinaria, 802f
  síntesis, 801, 810, 810f, 932, 1151
  y somnolencia, 810 – 811
Serpinas, 383, 1041
Sialidosis, 683ap
SIDA, 183, 318 – 319, 456
Silenciosas, mutaciones, 238
Silla estable, conformación, 446f
Simetría binaria, 335
Sin sentido, codones, 236
Sin sentido, mutaciones, 193, 193f, 238
Sinapsina, 996, 996 – 997
Sinapsis, 993 – 994, 993f, 993t, 994f
  eléctricas, 993
  químicas, 993
Sinaptobrevina/VAMP, 997
Sinaptofisina, 997
Sinaptotagmina, 997
Sindecán, 688
Síndrome
  de Cockayne, 229ap
  de Crigler-Najjar675ap, 1075ap
  de Cushing y obesidad, 862ap
  de Dubin-Johnson, 1075ap
  de Ehlers-Danlos,
    tipo IV, 270ap
    tipo VII, 271ap
  de Gilbert, 1075ap
  de glucoproteína deficiente en gúcidos, 672ap
  de la inmunodeficiencia adquirida. *Véase* SIDA; VIH
  de la muerte súbita infantil, 300ap, 716ap
  de Lesch-Nyhan, 293ap, 454ap, 826, 835, 836ap
  de Menke, 1163
  de Morquio, 688ap
  de Reye, 869, 869ap
  de Rotor, 1075ap
  de Rubenstein-Taybi, 349ap
  de Wernicke-Korsakoff, 670ap, 1149 – 1150, 1150ap
  de Zellweger, y función del peroxisoma, 22ap
  del cromosoma X frágil, 194, 215ap
  del cuerno occipital, 271ap
  del dolor respiratorio, 731ap
  del estrés en porcinos, 621ap
  del exceso aparente de mineralocorticoide, 977ap
  miasténico de Lambert-Eaton, 997ap
  parecido al de Reye, 716ap
SINE, 191
Sintaxina, 997
Síntesis, velocidad, 139f
Síntesis a través de la lesión, 201, 201 – 202, 201f
Síntesis de Fourier, 149
Síntesis de grupos ferrosulfurados, 1057ap
Síntesis discontinua, 166
Síntesis retrógrada, 166
Síntesis semidiscontinua, 166
Sintetasa, 418
Sistema de cascada hormonal, 906, 907 – 912, 907f, 909f
Sistema de control cíclico, 624, 624f
Sistema de cotransporte antiparalelo aspartato-glutamato, 632
Sistema de cotransporte sodio-ácidos biliares, 1111 – 1112
Sistema de fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato, 527
Sistema de reordenamiento de azúcares, 668, 669f
Sistema de transportadores, 513
Sistema de transporte de ácidos biliares, mecanismos moleculares, 1112, 1112f
Sistema de transporte facilitado, 514
Sistema excitón, 151
Sistema inmune y desnutrición proteica y energética, 1123
Sistema Nervioso Central. *Véase* Cerebro
Sistema portal, 934
Sistema renina-angiotensina, 967, 971f
Sistemas de membrana artificiales, 504
Sistemas de transporte dependientes de sodio, 1100
Sistemas de transporte electrónico, 466, 522
Sistemas que producen energía, conexión con sistemas que la utilizan, 538 – 539, 539f
Sistemas que utilizan energía, conexión con los sistemas que la producen, 538 – 539, 539f
Sitio A, ribosómico, 250
Sitio activo extendido, 381
Sitio aminoacilo, ribosómico, 250
Sitio apurínico-apirimidínico (AP), 191
Sitio atenuador, del operón triptófano, 340f, 341
Sitio dador, ribosómico, 250
Sitio de salida, ribosómico, 250
Sitio E, ribosómico, 250
Sitios alternativos de la iniciación de la traducción, 265
Sitios alternativos de la iniciación de la transcripción, 264, 264 – 265
Sitios cos, 305
Sitios de ensamblaje de la RNA polimerasa, 347
Sitios de iniciación, 133
Sitios de unión a factores de transcripción, 347
Sitios P, ribosómico, 250
Sitios peptidilo, ribosómico, 250
SMP-DNA, 56 – 58, 57f
snRNA. *Véase* RNA nuclear pequeño
Sobrenutrición, 1118
Sodio
  canal epitelial de, 1090 – 1091
  en los enterocitos, concentraciones y potenciales eléctricos de, 1090 – 1091, 1090f
  activo, 522
  flujo electrogénico, 1090 – 1091, 1091f
  hidrógeno (Na^+,H^+), bomba, 528t
    en células de mamíferos, 528t
  potasio (Na^+,K^+), bomba, 522 – 523, 523f, 528t. *Véase también* ATPasa
  sistemas de transporte dependientes de, 1100
  transporte
    activo, 522
    intestinal, 1090 – 1091
Sodio/hidrógeno (Na^+/H^+), intercambio, 1091, 1092f
Sodio-ácidos biliares, sistema de cotransporte, 1111 – 1112
Sodio-glucosa, cotransporte, 1094ap, 1095 – 1096
Sodio-glucosa, transportador de, 1095 – 1096, 1095f, 1103, 1103t
  SGLT1, propiedades, 1103, 1103t
Soluto(s)
  en el medio celular, 6 – 14
  transporte epitelial, 1088 – 1090, 1089f
Somatocrinina. *Véase* Hormona liberadora de hormona de crecimiento
Somatostatina
  acciones, 913t
  estructura, 924, 924t
  orígenes, 913t
Sondas de DNA, 295, 295 – 296
Sondas de RNA, 295, 296 – 297
Sorbitol, 1005, 1005f
  formación, 638f
  y diabetes, 889ap
Sordera inducida por antibióticos, 254ap
Sordera nerviosa, 719ap
SOS, respuesta, 202, 202 – 203, 203f
Southern, técnica de transferencia, 297 – 298, 297f
SREBP-1a, 359 – 360, 360f
St. John's wort, 483
Subfragmento 1, 1019, 1021f
Subunidad G, 655 – 656, 656f
Subunidades catalíticas, y subunidades reguladoras, 440
Subunidades reguladoras, 440, 440, 440f
Succinato, 556, 556f
Succinato deshidrogenasa, 431, 431f, 555, 569 – 570, 569f
Succinato tioquinasa, 556
Succinil CoA sintetasa, 555
Succinilcolina, 518
Sucinil CoA, 554 – 555, 555, 814f, 1065, 1067
Sueño, metabolismo del triptófano y, 810 – 811
Sulfamidas, 434 – 435
  y anemia hemolítica, 668ap
Sulfanilamida, 434 – 435, 434f

Sulfatasas, 20t, 688
  deficiencia múltiple de, 267ap, 688ap
Sulfátidos, 499, 759, 759f, 1177
  estructura, 499, 500f
Sulfato, 807f, 808
Sulfito, 808
Sulfogalactocerebrósido. *Véase* Sulfátidos
Super corrimiento, 302
Superespiralación, 169
Superficie corporal, área, y consumo de energía, 1118
Superficies aniónicas, 1032
Superhelicoidal, DNA, 60, 60 – 66, 60f, 61f, 68, 70f
  descripción geométrica, 62 – 64, 63f
Superóxido dismutasa, 1163
Superplegamientos, 119
Suprarrenales, hormonas, 960
Supresoras, mutaciones, 241
Sustancia P, 914t, 1002, 1002t
Sustitución nucleofílica, en un carbono acílico, 1171
Sustrato(s), 414
  centro de fijación, 414 – 415, 437ap, 440
  complementariedad con el enzima, 441 – 443
  concentración , y orden de reacción, 453f
  especificidad de enzimas, 441 – 443
  interacciones secundarias, 381
  lanzaderas de, 584, 585f
  niveles sanguíneos, 874t
  tensión del, 441, 441 – 443, 441f, 445 – 446, 446f
  y enzimas relacionados, 20t
Sustrato exógeno, 476
Sustratos dirigidos al sitio activo, 380
Sustratos lipofílicos, exógenos, oxidación por el P450, 476 – 480, 476t, 477t, 478f, 479f
Sustratos proquirales, 443
Sustratos suicidas, 435, 482
SV-2, 998
Svedberg
  coeficiente, 142, 142f, 142t
  unidad, 142
SWI/SNF, complejo, 349
Symport, 515, 515f, 526, 528t
$t_{1/2}$ (vida media de una reacción), 420
Talasemia, 224ap
α-Talasemia, 239ap
Tamoxifeno, 358ap
Tangier enfermedad de, 128ap
Tapón plaquetario, formación, 1039 – 1041, 1040f
TATA, proteína de unión a, 351, 351f, 391f
Taurina, 807f, 808, 1105
Taurocolato, mecanismo molecular del transporte de, 1112, 1112f
Tauroconjugados, 1107, 1107t, 1111
Tay-Sachs, enfermedad de, 683ap, 763t
TCA, ciclo. *Véase* Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Técnicas proteómicas, 144 – 146
Tejido adiposo, 602, 603, 1119
  blanco, 706, 707
  captación de glucosa y, 602, 602f
  en el ciclo ayuno-alimentación, 881 – 883
  lipasas en el, 709
  reservas energéticas en el, 873t
Tejido en crecimiento, características, 849 – 850
Tejido nervioso, 990 – 1002, 991f. *Véase también* Neuronas; Neurotransmisores
  formación de hidroxiácidos grasos en el, 705
Telomerasas, 181
  como diana de agentes anticancerígenos, 56ap
  terminación de la replicación, 181 – 183, 182f, 183f
Telómeros, 55, 67, 181
  terminación de la replicación, 181, 181f
Telopéptidos, 125
Temperatura, y actividad catalítica enzimática, 450 – 451, 451f
  en la anemia hemolítica, 451ap
Temperatura de cambio de fase, 509 – 510
Teniltrifluoroacetona, 575
Terapia de reposición de electrolitos para la diarrea, 1094ap
Tercera edad
  deficiencia de niacina en la , 1151
  necesidades nutricionales de la, 1165, 1165ap
Terfenadina (Seldane), metabolismo, 481ap
Termodinámica, 540, 540 – 547
  clasificación de compuestos, 543, 544t, 545, 545t
  contenidos energéticos de sustancias de la dieta, 543, 543t
  energía libre, 541 – 542, 542t
    determinación de la variación, 545
  primer principio de la, 540
  segundo principio de la, 540, 540 – 541
  transferencia de energía de enlace, 545 – 547, 546f, 547f
Termolisina, 428
Terpenos, 1175, 1178
Testículos, metabolismo glucídico en los, 600
Testosterona, 472, 960, 964
  colesterol como precursor, 742
  estructura, 961t
  funciones, 961t
  rutas de excreción, 968t
  secreción, 928, 929f, 961t
  síntesis, 964, 969t, 972
Tetrabucle, RNA, 81 – 82
Tetraciclinas, inhibición de la síntesis de proteínas, 255
Tetrahidratofolato reductasa, inactivación dirigida al centro de la 436f
Tetrahidrobiopterina, 487, 837, 837f
  enzima dependiente de, 797, 799f
Tetrahidrofolato(s), 435f, 794, 795f, 830, 1154. *Véase también* Ácido fólico
  centro activo, 796f
  en el metabolismo de aminoácidos, 794 – 797, 796f
  formación, inhibición, 855f
  interconversión, 796f
  reacciones de reducción en las que intervienen, 797f
  y síntesis de novo de purina y dTMP, 855 – 856, 856f
Tetrahymena thermophila, 86, 87f
Tetra-*N*-acetilquitotetrosa-γ -lactona, 444f
Tetrayodo-L-tironina. *Véase* Tiroxina
Tetrosa, formación, 668, 669f
TFII-H, 196, 196 – 197
THF. *Véase* Tetrahidrofolatos
Tiamina. *Véase* Vitamina B_1
Tiamina pirofosfato, 549, 555, 1148 – 1149, 1149, 1149f
Tiamina trifosfato, 1149
Tiazofurina, estructura, 857f
Tiazofurina adenina dinucleótido, 857
Timidilato, síntesis, 797
Timidilato quinasa, gen, como marcador para la selección de células transfectadas, 311 – 312
Timidilato sintasa, 845
Timina, 29f, 30
  degradación, 847f
Timopoyetina, 914t
α-Timosina. *Véase* Timopoyetina
Tiocisteína, 808, 808f
Tioesterasas, 701, 706
6-Tioguanina, en el tratamiento de la leucemia, 854
Tiohemiacetal, 606
Tiolésteres, 544t
Tiólisis, 713
Tiorredoxina, 844, 1047
Tiorredoxina reductasa, 844
Tiosulfato, síntesis, 808f
Tipo complejo de *N*-oligosacáridos, 260, 260f
Tipo con alto contenido en manosa de *N*-oligosacáridos, 260, 260f
Tiroglobulina, en la síntesis de hormonas tiroideas, 919 – 920
Tiroides, hormona estimuladora de la, 910
  acciones, 913t, 928, 948t
  interacciones hormona receptor, 939, 939f
  orígenes, 913t
Tirosina, 95, 797 – 803
  degradación, 800f
  derivados de , 799 – 803
  en las rutas de la proteína quinasa, 943
  metabolismo, 798 – 799
    enfermedades del, 801ap
  terapia con, 800
Tirosina aminotransferasa, 798, 800f
  deficiencia, 801ap
Tirosina hidroxilasa, 801
Tirosina sulfatada, 1087
Tirosinasa, 801 – 802, 802f
Tirosinemia, 801ap
Tirosinemia hepatorrenal, 801ap
Tirosinemia oculocutánea, 801ap
Tirotropina. *Véase* Hormona estimuladora de la tiroides
Tiroxina, 869, 1162
  estructura, 922f
  liberación, 920, 923f
  síntesis, 919 – 920, 922f
dTMP. *Véase* Desoxitimidilato
TNF. *Véase* Factor de la necrosis tumoral
TPA. *Véase* Activador tisular del plasminógeno
TPP. *Véase* Tiamina pirofosfato
α-Tocoferol, 1146
Todo-*trans*-retinol, 1008
Todo-*trans*-retinol deshidrogenasa, 1010
Topaquinona, 803, 803f
Topoisomerasas, 64 – 66, 64f, 65f, 66t, 169, 171, 171f, 175
  como diana de fármacos, 175ap
  en el tratamiento de enfermedades, 65ap
  tipo I, 64, 64f, 66t
  tipo II, 64, 64 – 65, 65f, 66t
Torsión de hebras de DNA, 169
Toxemia, en el embarazo, 984ap
Toxina del cólera, 760 – 761, 1094ap
Toxina diftérica, inhibición de la síntesis de proteínas, 255
Toxinas
  gangliósidos como receptores, 760 – 761
  inhibición de la síntesis de proteínas, 255
  interferencia con la RNA polimerasa, 211ap
  producidas por el citocromo P450, 479 – 480
Toxinas botulínicas, 997
Tracto gastrointestinal, 1082 – 1084, 1083f, 1092 – 1094, 1092f
Traducción, 28, 28f, 234, 234 – 245, 235
  coste energético, 251
  direccionalidad y colinealidad, 245
  factores de elongación. *Véase* Factores de elongación

iniciación alternativa, 265
interacciones codón-anticodón, 236 – 239, 236f
mRNA, 234 – 235, 245
nucleótidos, 235 – 236
regulación, 271 – 272
ribosomas, 242, 243f – 245f, 243t, 244 – 245
sitios alternativos de la iniciación de la, 265
tRNA, 235
aminoacilación de, 239 – 242
Transaldolasa, 668, 669 – 670
Transaminación, 558, 559f, 782, 782f. *Véase también* Aminotransferasas
Transaminasas, 417, 425, 425f, 446. *Véase también* Aminotransferasas; Transaminación
Transcelular, transporte epitelial, 1088 – 1089, 1089f
Transcetolasa, 668 – 670, 1149
deficiencia de, 670ap
Transcortina, 974
Transcripción, 18, 28, 28f, 208 – 220, 209 – 210, 210t, 642
activación, 215 – 216, 216f
base enzimática para la acción, 219 – 220, 220f
carcinogénesis, 217ap
en bacterias, 330 – 332
en eucariotas, 214 – 220
cromatina activa, 214 – 215, 215f
proteínas reguladoras, 354 – 357, 355l – 357f
RNA polimerasa, 215 – 220, 216f, 218f – 220f
secuencias que influyen en la, 353 – 354, 353f
en procariotas, 211 – 214
elongación, 212, 213f, 214
inicio de la síntesis, 212, 213f, 214f
reconocimiento de promotores, 211 – 212, 213f, 214f
terminación, 214, 215f
información en las secuencia de DNA señalizan la síntesis de RNA, 209, 209f
reparación del DNA acoplada a la, 228 – 229
RNA polimerasa, 209 – 210, 210t, 211ap
en eucariotas, 215 – 220, 216f, 218f – 220f
sitios alternativos de la iniciación, 264, 264 – 265
sustancias que interfieren con la RNA polimerasa, 211ap
Transcripción inversa, 28
Transcriptasa inversa, 28, 191
Transcriptasa inversa PCR, 300, 304f, 305
Transducción de señal, 907, 1016
contracción muscular, 1016 – 1018, 1017f, 1018f, 1019t
papel de los inosítidos, 732 – 733, 732f, 733f
Transducina, 1010
Transesterificación, 163
Transfección, 311, 311
Transferasas, 417
Transferencia de grupos amino, 782, 782f
Transferencia Northern, 300
Transferencia Southern, técnica, 297 – 298, 297f
Transferencias de energías de excitación, 152
Transferrina, 1054, 1074 – 1075
receptores de, 1055, 1060f
hemocromatosis tipo II y, 1063ap
Transformación, 28 – 29, 29
bacteriana con DNA recombinante, 290
Transformilasa, 252
Transición(es), 193
Translocación, en el transporte a través de membranas, 514, 514f
Translocación de grupo, 513, 526 – 527, 528t
Translocador, 514
Translocador nuclear del receptor Ah, 483
Translocasa, 250, 514
tipo F, 522
tipo P, 522
tipo V (vacuola), 522
Translocones, 256
Transmisión nerviosa, 487
Transplantes, 488
Transportador(es)
ABC, 525 – 526, 525f
aminoácidos ácidos, 1100
Ca_2^+, 524
Cl^-/HCO_3^-, 528t
de dopamina, 1000
de glucosa, 520, 520t, 602 – 603, 602f, 660, 1095 – 1096, 1095f, 1103, 1103t
isoformas de, 520, 520t
tejido adiposo y, 602, 602f
de lípidos, 509
de membrana, 513. *Véase también* Cotransportadores; Transporte a través de membranas, sistemas
de metales divalentes 1, 1059
de monosacáridos, 1103
independiente de sodio, 1103
de sodio-glucosa, 1095 – 1096, 1095f, 1103, 1103t
SGLT1, propiedades, 1103, 1103t
de una unidad monocarbonada, 794
facilitado activo, 522
fijadores de ATP, 525 – 526
glucosa, 520, 520t, 602 – 603, 602f, 660, 1095 – 1096, 1095f, 1103, 1103t
H^+,K^+, 528t
independiente de sodio, 1100
intercambio citrulina/ornitina, 789
móviles, 529
Na^+,HPO_4^{2-}, 528t
primario activo, 522
secundario activo, 522
sistema de, 513
tipo E1-E2, 523
Transporte. *Véase también* Transporte a través de membrana
activo, 513, 515
gastrointestinal, 1089, 1089f
isohídrico, 405, 405f
pasivo, 514t, 515
facilitado, 514t, 519 – 522
sistemas de dependientes de sodio, 1100
Transporte a través de membrana, 494, 511 – 516
activo, 513, 515
facilitado, 514t, 522 – 527
primario, de iones calcio, 523 – 524
secundario, 526, 526f
cinética de saturación, 512f, 514
de aminoácidos, 526
de glucosa, 526, 526f
en células de mamíferos, 527 – 528, 528t
energética del, 515 – 516
facilitado, 514 – 515, 514f
facilitado pasivo, 514t, 519 – 522
mecanismo electrogénico, 515, 529t
pasivo, 513, 515
pasos del, 514 – 515
liberación, 515
reconocimiento, 514
recuperación, 515
translocación, 514 – 515, 514f
por difusión, 511 – 512, 512, 512f
por translocación de grupo, 513
sistemas, 512 – 513, 513t
características, 513 – 514, 514t
cinética de saturación, 512f, 514
especificidad, 514
pérdida de, enfermedades causadas por la, 529ap
transportadores para el, 513. *Véase también* Cotransportadores; Transporte a través de membrana, sistemas; Transportadores
variación de energía libre en el, 515
velocidad de difusión en, 511 – 512, 512, 512f
Transporte ATP-ADP en células de mamíferos, 528t
Transporte axónico rápido, 1002
Transporte de ATP-ADP translocasa, 521 – 522, 521f
Transporte de acilo, a través de la membrana mitocondrial, 713 – 714
Transporte de cloruro, 520 – 521, 520f
Transporte de energía, anormalidades genéticas, 711ap
Transporte de iones inorgánicos, en células de mamíferos, 528t
Transporte de taurocolato, mecanismo molecular, 1112, 1112f
Transporte de vesículas, 997
Transporte electrónico
mitocondrial, razones P/O, 578
sistemas de, 522
citocromo P450, 468 – 470, 468f
NADPH-citocromo P450 reductasa, 468 – 469, 469f
Transporte epitelial, 1088 – 1096, 1089f
paracelular, 1088 – 1090, 1089f
transcelular, 1088 – 1090, 1089f
Transporte facilitado, sistema de, 514
Transporte isohídrico, 405, 405f
Transporte mediado por transportador, 1099 – 1100, 1103
Transposasas, 345, 346
Transposición, 190, 190 – 191
Transposones, 190, 345, 345 – 347
estructura, 345, 345f
Tn3, 345 – 347, 346f
Transulfuración, 803, 805ap
Transversiones, 193
Trastornos metabólicos
de aminoácidos ramificados, 813ap
de la síntesis de la urea, 789 – 790
de la síntesis de tirosina, 801ap
Tratamiento de la leucemia, 458, 854
Tratamiento de la tuberculosis, 784
Tratamiento radioterápico y ácido úrico, 840ap
Trazos densitométricos, 458f
Trehalasa, 1085t, 1103, 1103t
Trehalosa, 1101t, 1103
Treonina, 97, 680 – 681, 682f, 797, 798f, 943
Tretraplex, 54, 54 – 55, 54f, 55f
Triacilglicerol lipasa sensible a hormonas, en la hidrólisis de triacilglicerol, 712, 712t
Triacilgliceroles, 694, 696, 696 – 697, 706 – 709, 1104, 1126 – 1127, 1176
aumento de los, 711ap
digestión, 1104, 1105f
hidrólisis, 1105, 1105f
metabolismo, 694, 712t
movilización, 709
nivel sérico, ingestión de glúcidos y, 1129, 1130ap
sanguíneos, hidrólisis, 712
síntesis, 707f, 708, 708f, 891 – 892
transporte, 711
Tríada catalítica, 999

Trihidroxifenilalanilquinona. *Véase* Topaquinona
Trimetil-lisina, 872
Triosa, formación, 668, 669f
Triosa fosfato isomerasa, 605
Triple hélice, formación, 269
Tripletes, expansión de, 193, 193 – 194, 193f
Tripletes de bases
  de Hoogsteen, 51, 51 – 52, 51f
  de Hoogsteen inverso, 51 – 52, 51f, 52
  y enfermedades genéticas, 58ap
Tripsina, 117f, 147, 386f, 387t, 1019, 1098t, 1099
  inhibidor de la, 381f, 1099
Tripsinógeno, 381f, 1099
Triptófano, 95, 338, 808 – 811, 809f, 1151
Triptófano dioxigenasa, 808
Triptófano pirolasa. *Véase* Triptófano dioxigenasa
Triptófano oxigenasa. *Véase* Triptófano dioxigenasa
Trisacáridos, 1102
Triyodotironina, 869, 1162
  estructura, 922f, 981, 981f
  liberación, 920, 923f
  síntesis, 919 – 920, 922f
tRNA. *Véase* RNA de transferencia
$tRNA^{Trp}$ sintetasa, 341
Trombina, 452, 1035, 1037f, 1038f, 1044, 1044f
  formación, 1034
  receptor de, 1039
Trombomodulina, 688, 1043, 1044
Trombosis cerebral, 488
Tromboxanos, 766, 1176, 1176
  A_2, 1040, 1040 – 1041
  estructura, 1176
  TXA_2, 1129ap
Tropomiosina, 126, 126f, 1023
Troponina, 1023, 1023 – 1024, 1023f
  C, 524
  marcadores del infarto de miocardio, 1024ap
Tuberculosis, tratamiento de la, 784
Tubo neural, malformaciones, 1155ap, 1156
d-Tubocurarina, 518
Tubulina, 22
Tumor(es), origen clonal, determinación mediante RFLP, 299ap
Tumores deficientes en asparagina sintetasa, tratamiento, 786
Tumores mamarios, 482
Tumorígenos, agentes, 654
Tunicamicina, 258
U (unidad de actividad enzimática), 421
UAG. *Véase* Uracilo DNA glicosilasa
Ubiquinona, 567
Ubiquinona oxidorreductasa, 567 – 568, 567f, 568f
Ubiquitina, 272, 272 – 273, 273f, 787
UCP-1, 586 – 587, 587f
Úlceras pépticas, prostaglandinas y, 770
Ultracentrifugación, 142
UMP. *Véase* Uridina 5′-monofosfato
dUMP. *Véase* 29-Desoxiuridina 5′-monofosfato
Unión de Holliday, 186, 187f, 188
Unión en hendidura cardíaca, 519f
Unión en hendidura cardíaca recombinante, 519f
Unión neuromuscular, 1025, 1025f
Unión reversible, 668
Uniones de cementación, 1088, 1092 – 1094
Uniones en hendidura, 518 – 519, 518f, 519f
  cardíaca recombinante, 519f
Uniones sinápticas, 994
  terminación de señales, 998 – 1001
Uniport, 515, 515f, 520, 529t
Universalidad del código genético, 235
UQH2, 567
Uracilo, 29, 29f, 30, 828, 829, 847f
Uracilo DNA glucosidasa, 194, 194 – 195
Urea, 528t, 787, 788f, 789, 877
  síntesis, y gluconeogénesis, 634 – 636, 635f
Urea, ciclo de la, 787 – 790, 789f
  alternativas al, 790f
  enzimas, 788, 789
    deficiencias, 790, 791ap
  trastornos metabólicos, 789 – 790
Ureidopropionasa, 848
Uridina 5′-monofosfato, 840 – 842, 842f
Uridina, 30, 30f
  adminstración oral de, 839ap
Uridina forforilasa, 846
Urobilina(s), 1073
Urobilinógenos, 1073
Uroporfirinógeno(s), 1065, 1069 – 1070, 1069f
Uroporfirinógeno descarboxilasa, 1070
Uroporfirinógeno III sintasa, 1069
USDA, pirámide alimentaria, 1131
UTP
  en la formación de CTP, 842f
  formación a partir del UMP, 842f
V, regiones, 370
V_{max}, 423, 437
Vacas locas, enfermedad de las, 257ap
Vacunas de DNA, 29ap
Vacuolas digestivas. 20
Valina, 95, 96f, 782f, 787, 811, 813f
Valinomicina, 529, 529f, 529t, 530f
Van den Bergh, reacción de, 1073
Van der Waals
  distancia de contacto, 138, 138t
  fuerza de, 137 – 138, 138f, 1172
Variaciones diurnas de la secreción hormonal, 931
Variantes alélicas, 485
Vasodilatador, 486
Vasopresina, 908, 910t, 914t
  acciones, 913t, 914t, 945 – 948, 947f, 948t
  estructura, 924, 924t
  orígenes, 914t
  secreción, 946 – 947, 947f
  síntesis, 916, 917f
Vector de clonación, 288
Vector de expresión, 304, 309, 310 – 312, 310f
Vectores cósmidos, 307
Vectores lanzadera, 310
Velocidad de difusión, 511 – 512, 512, 512f
Velocidad de reacción, 414, 420 – 421
Velocidad de recambio de las proteínas del cerebro, 991
Velocidad inicial de reacciones catalizadas por enzimas (v_1), 419, 422, 422f
Velocidad máxima (V_{max}), 421
Venenos, 434ap. *Véase también* Toxinas
Verificación, factores de, 180
Versicán, 688
Vesícula biliar
  funciones, 1083f, 1084
  y colesterol, 1109ap
Vesículas, transporte de, 997
Vesículas multilamelares, 504
Vesículas recubiertas, 941, 943f
Vesículas sinápticas, 995, 995f, 995t, 996f
Vesículas unilamelares, 504
Vibrio cholerae, 760
  diarrea causada por, 1094ap
  toxina, 760 – 761
Vibrio vulnificus, 1055ap
Vida media de una reacción ($t_{1/2}$), 420
VIH, 183, 318 – 319, 857
  biosíntesis de proteínas, cambio programado del marco de lectura, 241ap
  detección, 456, 457f
  proteasa del, representación estereoscópica de la estructura, 150f
  rastreo, reacción en cadena de la polimerasa y, 282ap
  terapia, análogos de los nucleósidos y resistencia a fármacos, 184ap
VIP. *Véase* Polipéptido intestinal vasoactivo
Virus. *Véase también* virus específicos
  en vectores de expresión, 311 – 312
Virus de simios, 40
  en vectores de expresión, 311
  genoma, 239, 240f
Visión. *Véase* Ojo(s)
Visión del color, 1013 – 1014, 1015f, 1016
Visión tricromática del color, 1014
Vitamina(s)
  absorción, 1108
  deficiencia en el alcoholismo, 1150ap
  hidrosolubles, 1148 – 1159
    deficiencias, 1148
    frente a liposolubles, 1148
    función de coenzima, 1148
    hematopoyético, 1154 – 1156
    liberadoras de energía, 1148 – 1153
  liposolubles, 1139 – 1147
    estructura, 1178
  y requerimientos de anticonvulsivos, 1148ap
Vitamina A, 1008, 1139 – 1141
  deficiencia, 1141
  en la visión, 1141, 1141f
  estructura, 1140, 1140f, 1178
  fuentes de la dieta, 1141
  mecanismo de acción, 1141
  metabolismo, 1140, 1140f
  toxicidad de la, 1141
Vitamina B_1, 1148 – 1150
  deficiencia, 1149 – 1150
  estructura, 1148f, 1149
  requerimientos, 1150
  terapia con, 813ap
Vitamina B_6, 426, 426ap, 1151. *Véase también* Piridoxal fosfato
  deficiencia, 784, 810, 1151 – 1152
  estructura, 1151, 1151f
  evaluación del estado respecto a la, 1152, 1153ap
  requerimientos, 1152, 1153ap
    y terapia anticonvulsiva, 1148ap
Vitamina B_{12}, 1156
  deficiencia, 1156 – 1157
  estructura, 1156 – 1157, 1156f
  fuente de la dieta, 1157
  metabolismo, 1156 – 1157, 1157f
  papel metabólico en el metabolismo monocarbonado, 1155f
Vitamina C, 873, 1158
  deficiencia, 1158
  funciones, 1157 – 1159
  megadosis, 1158 – 1159
  niveles séricos, factores que afectan a los, 1158
  precursores, 674 – 675
  requerimientos, 1158
  transporte, en células de mamíferos, 528t
  y resfriado común, 1158 – 1159
Vitamina D
  D_2 (ergocalciferol), 1142
  D_3 (colecalciferol). *Véase también* 1, 25-Dihidroxi vitamina D_3 (1α, 25-dihidroxicolecalciferol); 25-Hidroxi vitamina D_3 (25-hidroxicolecalciferol)
    acciones, 972 – 973
    estructura, 1178
    metabolismo, 960
    síntesis, 972 – 973, 1141 – 1142

deficiencia, 1144
en la homeostasis del calcio, 1142, 1144, 1145f
estructura, 1143f
fuentes en la dieta, 1142, 1144
hormona paratiroidea y, 1142, 1144
requerimientos
en neonatos, 1147ap
y terapia anticonvulsiva, 1148ap
síntesis, 753 – 754, 754f, 1141 – 1144
sistema endocrino, 972 – 973, 972f
toxicidad, 1144
Vitamina E, 1144
como antioxidante, 1146
deficiencia, 1144
estructura, 1178
requerimientos, 1146
suplementación, 1146
en neonatos, 1147ap
tocoferoles en la, 1144, 1146
toxicidad, 1146
Vitamina K, 1047, 1146 – 1147
deficiencia, 1147, 1147ap
epóxido de la, 1047
función, 1146, 1146f
papel en las reacciones de las carboxilasas de proteínas, 1047 – 1049, 1047f
síntesis, 1147
K_1(fitilmenaquinona), 1146
K_2 (multiprenilmenaquinona), 1146, 1178
requerimientos
en neonatos, 1147ap
y terapia anticonvulsiva, 1148ap
VLDL. *Véase* Lipoproteínas de muy baja densidad
Von Gierke, enfermedad de, 647ap
Von Willebrand, factor de, 1037
Warfarina, 1048
Wernicke-Korsakoff, síndrome de, 670ap, 1149 – 1150, 1150ap
Wilson, enfermedad de, 1163
Wolman, enfermedad de, 21ap
Xantina, 828
Xantina oxidasa, 840, 840f
Xenobióticos, 476
oxidación por el P450, 476 – 480, 476t, 477t, 478f, 479f
Xeroderma pigmentoso, 196, 196ap
Xilito deshidrogenasa, deficiencia de, 675ap
Xilulosa 5-fosfato, 668 – 670
Xilulosa
estructura, 1172
UDP-, 674 – 675
XP. *Véase* Xeroderma pigmentoso
YAC. Cromosomas artificiales de levadura
Yodo, en la síntesis de hormonas tiroideas, 919 – 920
Yodo de la dieta, 1162
Yodoacetato, 613
Zellweger, síndrome, y función del peroxisoma, 22ap
Zidovudine. *Véase* Azidotimidina
Zimógeno(s), 378, 1085, 1098 – 1099
gránulos de, 1085
Zinc
absorción, 1162
como ácidos de Lewis, 428, 429, 429f
como cofactor, 1162
deficiencia
metaloenzimas, 1098t, 1099, 1162
proteasas con, 428
ZPI. *Véase* Proteína Z
Zwitterión, forma, 103, 103 – 104, 1179

VALORES CLÍNICOS NORMALES: SANGRE*

SUSTANCIAS INORGÁNICAS

Amoníaco	12–55 μmol/litro
Bicarbonato	22–26 meq/litro
Calcio	8,5–10,5 mg/dl
Cloruro	100–106 meq/litro
Cobre	100 –200 μg/dl
Dióxido de carbono	24–30 meq/litro
Fósforo	3,0–4,5 mg/dl
Hierro	50–150 μg/dl
Magnesio	1,5–2,0 meq/litro
P_{CO_2}	35–45 mmHg
	4,7–6,0 kPa
pH	7,35–7,45
P_{O_2}	75–100 mmHg
	10,0–13,3 kPa
Plomo	10 μg/dl o menos
Potasio	3,5–5,0 meq/litro
Sodio	135–145 meq/litro

MOLÉCULAS ORGÁNICAS

Acetoacetato	negativo
Ácido ascórbico	0,4–15 mg/dl
Ácido láctico	0,5–2,2 meq/litro
Ácido pirúvico	0–0,11 meq/litro
Ácido úrico	3,0–7,0 mg/dl
Bilirrubina	
Directa	0–0,4 mg/dl
Indirecta	0,6 mg/dl
Carotenoides	0,8–4,0 μg/ml
Colesterol: deseable	≤ 200 mg/d
Creatinina	0,6–1,5 mg/dl
Fenilalanina	0–2 mg/dl
Glucosa	70–110 mg/dl
Lípidos	
Totales	450–1000 mg/dl
Ácidos grasos totales	190–420 mg/dl
Colesterol	120–220 mg/dl
Colesterol HDL como factor de riesgo	≤ 35 mg/dl
Colesterol LDL como deseable	≤ 130 mg/dl
Fosfolípidos	9–16 mg/dl como P de lípido
Triacilgliceroles	40–150 mg/dl
Nitrógeno de urea (BUN)	8–25 mg/dl
Vitamina A	0,15–0,6 μg/ml

PROTEÍNAS

Total	6,0–8,4 g/dl
Albúmina	3,1–4,3 g/dl
Ceruloplasmina	23–43 mg/dl
Globulina	2,6–4,1 g/dl
Glucagón	20-100 pg/ml
Hemoglobina	
hembras	12-16 g/dl
varones	13-18 g/dl
Insulina	0–29 μU/ml
Transferrina	191-365 mg/dl

ENZIMAS

Alamina aminotransferasa	
hembras	7–30 U/L
machos	10–55 U/L
Aldolasa	0–7 U/ml
Amilasa	4–25 U/ml
Aspartato aminotransferasa	
hembras	9–25 U/L
machos	10–40 U/L
Colinesterasa	0,5 pH U o más/h
Creatina quinasa (CK)	40–150 U/litro
Fosfatasa (ácida)	0,1–0,63 Sigma U/ml
Fosfatasa (alcalina)	13–39 U/litro
hembras	30–100 U/L
machos	45–115 U/L
Lático deshidrogenasa	110–210 U/litro
Lipasa	2 U/ml o menos
Nucleotidasa	1–11 U/litro

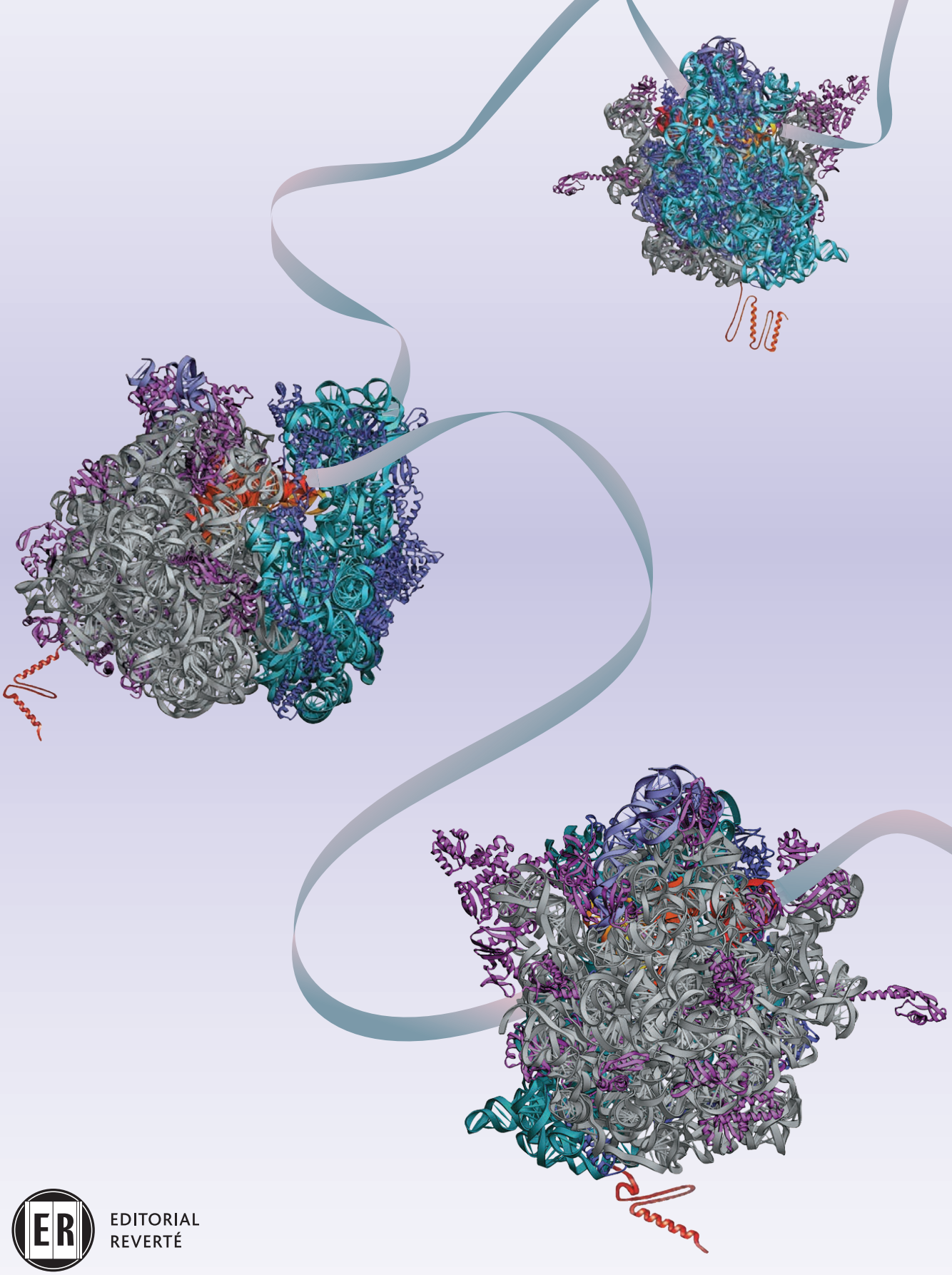
PROPIEDADES FÍSICAS

Hematocrito	37–52%
Osmolalidad	280–296 mOsm/kg H_2O
Tensión arterial	120/80 mmHg
Volumen sanguíneo	8,5–9,0% del peso corporal en kg

VALORES CLÍNICOS NORMALES: ORINA*

Acetoacetato (acetona)	0
Acidez valorable	20–40 meq/d
Ácido 5-hidroxiindol-acético	2–9 mg/d
Amilasa	24–76 U/ml
Calcio	0–300 mg/d
Cobre	0–60 μg/d
Coproporfirina	50–250 μg/d
Creatina	por debajo de 0,75 mmol/d
Creatinina	15–25 mg/kg de peso corporal/d
Fósforo (inorgánico)	variable; 1 g/d de promedio
Glúcido	0
Glucosa	120 μg/d o menos
Plomo	≤ 0,05 g/dl
Porfobilinógeno	0
Proteína (cuantitativa)	menos de 165 mg/d
Nitrógeno	6–7 g/dl
pH	5,0–9,0
Urobilinógeno	por encima de 1 Ehrlich U
Uroporfirina	0–30 μg/d

* Los valores seleccionados se tomaron de los valores de laboratorio de referencia normales que utiliza el Massachusetts General Hospital y que están publicados en el *New England Journal of Medicine* 314:39, 1986 y 327:718, 1992. El lector debe recurrir a la lista completa de dichos valores en la citada bibliografía para obtener información sobre los métodos y las unidades. U, unidades tal como se definen en el ensayo específico de una sustancia, p, pico, dl, decilitros (100 ml); d, día.



EDITORIAL
REVERTÉ

www.reverte.com